

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA MECHATRONIKY, INFORMATIKY A MEZIOBOROVÝCH STUDIÍ

Studijní program: **N 3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **3942T002 Nanomateriály**

Vliv velikosti mezivláknenných pórů na buněčnou proliferaci

The Effect of Pore Sizes on Cell Proliferation

Diplomová práce

Autor: Bc. Ivana Veverková
Vedoucí práce: Ing. Jiří Chvojka
Konzultant: Mgr. Jana Horáková

V Liberci 16.5.2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana Veverková**
Osobní číslo: **M11000301**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Vliv velikosti mezivláknových pórů na buněčnou proliferaci**
Zadávající katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte rešerši na dané téma.
2. Navrhněte geometrii pro speciální kolektory.
3. Připravte nanovláknenné struktury, proveďte jejich obrazovou analýzu.
4. Biologicky otestujte nanovláknenné materiály.
5. Zhodnoťte výsledky.

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 60 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

[1] FRESHNEY, R. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, c2010, xxxi, 732 p., [28] p. of plates. ISBN 04-705-2812-5.

[2] TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE INTERNACIONAL SOCIETY. Tissue engineering. Part B, Reviews. Vol. 18. New York: Mary Ann Liebert, Inc., 2012. ISBN 1937-3368.

[3] LANZA, Robert, Robert LANGER a Joseph P. VACANTI. Principles of Tissue Engineering. Burlington: Elsevier Academic Press, 2007. 1307 s. ISBN 0123706157.

[4] THE TEXTILE INSTITUTE. Textile progress. Vol. 41. London: Taylor and Francis, 2009. ISBN 0040-5167.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jiří Chvojka
Katedra netkaných textilií
Konzultant diplomové práce: Mgr. Jana Horáková
Katedra netkaných textilií

Datum zadání diplomové práce: 18. října 2012
Termín odevzdání diplomové práce: 17. května 2013


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 18. října 2012

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum: 16.5.2013

Podpis: *Jana Kovčová*

Poděkování

Děkuji Ing. Jiřímu Chvojkovi, vedoucímu práce, za důsledné odborné vedení práce. Děkuji rovněž Mgr. Janě Horákové za cenné informace z oblasti buněčné biologie a vedení laboratorního biologického testování.

Také děkuji za podporu a motivující prostředí Technické univerzity v Liberci v souvislosti s Centralizovaným rozvojovým projektem č. 12091 s názvem *Integrovaný systém vzdělávání v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanobiotechnologiích na UK, ČVUT a TUL*.

V neposlední řadě patří můj dík rodině a nejbližším, jejichž podpora a trpělivost mě provázely celým vysokoškolským studiem.

Anotace

Tato diplomová práce zkoumá vliv strukturovaných kolektorů na profil a uspořádání elektrostaticky zvlákněné vrstvy polymerních nanovláken. Experimentální výsledky prokázaly, že struktura kolektoru výrazně ovlivňuje ukládání nanovláken. Vytvořené nehomogenní nanovlákněné vrstvy imitují vzor kolektoru a v porovnání s konvenčními nanovlákněnými vrstvami vykazovaly větší mezivlákněné póry. Tyto charakteristiky mikro a makrostruktury podpořily lepší buněčnou proliferaci a penetraci buněčného materiálu do vytvořených strukturovaných nanovlákněných scaffoldů.

Klíčová slova: Hladinové elektrostatické zvláknění, speciální strukturované kolektory, tkáňové inženýrství, velikost pórů, polykaprolakton, polyvinylalkohol.

Annotation

The aim of the diploma thesis is the examination of the impact of structured collectors on the character and arrangement of electrospun layers of polymer nanofibers. As the results showed, the structure of the collector affects the storage of nanofibers. Inhomogeneous nanofiber layers imitate the pattern of the special collector. In comparison with conventional nanofiber layers, inhomogeneous nanofiber layers showed larger inter-fiber pores which supported better cell proliferation and cell penetration into nanofibrous scaffold.

Keywords: Needleless electrospinning, Special patterned collectors, Tissue engineering, Pore size, Polycaprolactone, Polyvinylalcohol.

Obsah

Seznam zkratk	8
Seznam pojmů a definic	9
Úvod	11
1 Tkáňové inženýrství	12
1.1 Tkáňový nosič	12
1.2 Nároky na scaffold	12
1.3 Materiály vhodné pro výrobu scaffoldů	13
2 Výrobní metody porézních scaffoldů	15
2.1 Sublimační sušení	15
2.2 Zpěňování	15
2.3 Vymývání částic	16
2.4 Lití polymeru a fázová separace	16
2.5 3D printing	17
2.6 Elektrostatické zvlákňování	17
3 Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy	20
3.1 Výhody elektrostaticky zvlákněných scaffoldů	20
3.2 Parametry elektrostaticky zvlákněných scaffoldů	21
4 Úvod do buněčné biologie	22
4.1 Buněčná stavba	22
4.2 Morfologie buněk	24
4.3 Buněčná adheze	25
4.4 Mezibuněčná hmota	25
5 Vliv porozity a velikosti pórů scaffoldu na buněčnou proliferaci	27
5.1 Pěnové scaffoldy pro tkáňové inženýrství	27
5.2 Význam pěnových scaffoldů pro tkáňové inženýrství	28
5.3 Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy pro tkáňové inženýrství	29
5.4 Význam elektrostaticky zvlákněných scaffoldů pro tkáňové inženýrství	41
6 Experimentální část	42
7 Materiály a metody	42
7.1 Materiál scaffoldů	42
7.1.1 Polyvinylalkohol	42

7.1.2	Polykaprolakton	43
7.2	Elektrostatické zvlákňování polymerních roztoků	44
7.2.1	Speciální strukturované kolektory	45
7.2.2	Průběh elektrostatického zvlákňování polyvinylalkoholu	46
7.2.3	Průběh elektrostatického zvlákňování polykaprolaktonu	47
7.3	Charakterizace materiálů	48
7.3.1	Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM).....	48
7.3.2	Parametry nanovláknenných vrstev	48
7.3.3	Statistické zpracování výsledků.....	48
7.4	In vitro testy	49
7.4.1	Biologický materiál.....	49
7.4.2	Test viability buněk	49
7.4.3	Fluorescenční mikroskopie	50
7.4.4	Rastrovací elektronová mikroskopie vzorků s buněčným materiálem ...	50
8	Výsledky.....	51
8.1	Struktura nanovláknenných vrstev.....	51
8.2	Charakteristika nanovláknenných vrstev 12hm% PVA.....	52
8.3	Charakteristika nanovláknenných vrstev 17hm% PCL	56
8.4	Buněčné testování scaffoldů	61
8.4.1	Buněčné testování 12hm% PVA.....	61
8.4.2	Buněčné testování 17hm% PCL	64
9	Diskuze.....	70
9.1	Struktura nanovláknenné vrstvy elektrostaticky zvlákněné na strukturované kolektory	70
9.2	Buněčná kolonizace elektrostaticky zvlákněných scaffoldů	71
	Závěr	72
	Seznam použité literatury	73
	Seznam obrázků	78
	Seznam tabulek	80
	Příloha A	81

Seznam zkratek

3D	- třídimenzionální
DNA	- deoxyribonukleová kyselina, nositel genetické informace
ECM	- extracelulární matrix
HA	- hydroxyapatit
nHA	- nano hydroxyapatit
MTT test	- test buněčné viability
PEG	- polyethylenglykol
PEO	- polyethylenoxid
PCL	- polykaprolakton
PDLLA	- kyselina poly-DL-mléčná
PLA	- kyselina polymléčná
PLLA	- kyselina poly-L-mléčná
PLGA	- kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové
PVA	- polyvinylalkohol
SEM	- rastrovací elektronová mikroskopie
SHE	- syntetický lidský elastin

Seznam pojmů a definic

Adheze	- přilnavost
Angiogeneze	- novotvorba cév
Apoptóza	- řízená buněčná smrt
Biodegradabilita	- schopnost biologického rozpadu
Biokompatibilita	- snášenlivost látek v biologickém prostředí
Biomimetický	- napodobující přírodní materiál či strukturu
Biopsie	- histologické vyšetření vzorku živého lidského orgánu nebo tkáně
Cytotoxický	- poškozující buňky
Disperzní	- rozptylující, rozkládající
Diferenciace	- vznik strukturně a funkčně specializované buňky
Extracelulární matrix	- síť, která vyplňuje mezibuněčné prostory
Eukaryotická buňka	- obsahuje pravé buněčné jádro a množství dalších organel oddělených membránou od okolí
Fibrila	- vlákénko, například kolagenní nebo svalové
Fibroblast	- buňka vazivové tkáně hvězdčovitého tvaru
Glykosaminoglykany	- lineární polysacharidy, tvoří velkou část mezibuněčné hmoty v pojivové tkáni
In vitro	- lat. „ve skle“; za umělých, laboratorních podmínek
In vivo	- lat. „v živém“, v živém organismu
Integriny	- proteinové receptory buněčného povrchu, které napomáhají adhezi buněk na extracelulární matrix
Jet	- tryskající proud kapaliny, polymeru
Karcinogenní	- vyvolávající rakovinu, též kancerogenní
Kmenová buňka	- nediferencovaná buňka, má schopnost se dělit a diferencovat
Koagulace	- srážení krve
Konfluence	- vznik kontinuální buněčné vrstvy
Krystalinita	- pravidelné geometrické uspořádání stavby polymerních řetězců
Mutagenní	- způsobující mutace
Ontogeneze	- původ a vývoj jedince

Permitivita ϵ	- fyzikální veličina popisující vztah mezi intenzitou elektrického pole a elektrickou indukcí v materiálu nebo vakuu, jednotka F/m
Plazma	- ionizovaný plyn složený z iontů, elektronů, vzniká odtržením elektronů z elektronového obalu atomů plynu či roztržením molekul; čtvrté skupenství hmoty
Proliferace	- množení skupiny buněk
Scaffold	- tkáňový nosič
Solubilita	- rozpustnost
Taylorův kužel	- mikroskopický prostorový útvar, který je výslednicí sil, jež panují na vrcholu trysky
Teratogenní	- schopné vyvolat u plodu vrozenou vývojovou vadu
Toxicita	- jedovatost, škodlivost látky pro živý organismus
Tropoelastin	- rozpuštěný předstupeň elastinu, peptidový řetězec složený z několika set aminokyselinových článků
Trypsinizace	- enzymatické rozvolnění, uvolnění buněk od povrchu
Vaskularizace	- cévní zásobení
Vezikul	- transportní, membránový váček
Viabilita	- životaschopnost
Viskoelasticita	- poměr deformace k napětí s časem mění., popis kombinací vlastností viskózní tekutiny a elastické pevné látky
Viskozita	- charakterizuje vnitřní tření kapaliny a závisí především na přitažlivých silách mezi částicemi

Úvod

V současné době dochází k velmi invazivnímu průniku techniky do všech směrů lékařských oborů. Pro nanotechnologie se tak otevřelo nové pole jejich potenciálního využití. Využití nanočástic a nanomateriálů v medicíně se dostalo do popředí pozornosti výzkumných týmů i veřejnosti, neboť toto je vědecký obor, jež je ve frekventovaném přímém kontaktu s lidskou společností všech sociálních skupin.

Tkáňové inženýrství se zabývá vývojem plně funkční náhrady lidské tkáně. Jako slibné biomimetické materiály se jeví elektrostaticky zvlákněné vrstvy nanovláken, které významně imitují přirozené prostředí extracelulární matrix, jež má vláknový charakter. Nicméně nanovláknenná vrstva vykazuje jisté nedostatky, z nichž pro tkáňové inženýrství zásadní je velikost mezivláknenných pórů. Velikost pórů v nanovláknenných vrstvách odpovídá řádově průměrům vláken, což je pro buněčný materiál nedostatečné. Snahou je tedy zvětšit póry v nanovláknenné vrstvě při zachování standardních průměrů vláken. Zvyšováním velikosti mezivláknenných pórů se zabývá tato diplomová práce. Metodou, kterou bylo dosaženo větších velikostí pórů v nanovláknenné vrstvě, je použití speciálních strukturovaných kolektorů vhodné geometrie. Struktura navržených speciálních kolektorů ovlivnila finální ukládací vláken a tím charakter nanovláknenné vrstvy. Vznikl tak scaffold, jež je pro proliferaci buněčného materiálu a penetraci buněk do objemu výhodnější.

V současném vývoji vysoce porézních scaffoldů je pro tvorbu pórů definovaných velikostí využíváno především porogenů v kombinaci s různými výrobními metodami. V těchto technikách dochází k chemické modifikaci materiálu, jež je navozena použitými částicemi a rozpouštědly. Ty mohou zanechat zbytky po zpracování, čímž se scaffold stává nebiokompatibilní. Použitím speciálních kolektorů při elektrostatickém zvláknění lze dosáhnout větších pórů v nanovláknenné vrstvě bez chemických modifikací procesu výroby či materiálu. Elektrostaticky zvlákněné nanovláknenné vrstvy lze specializovat aditivou či následnou povrchovou úpravou. Výhodou je v současné době již komerční dostupnost nanovláknenných vrstev, což snižuje cenu výrobku a minimalizuje čas potřebný k uvedení materiálu do praxe.

1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor, který spojením technických a přírodních věd usiluje o vývoj biologické struktury sloužící k obnově, zachování nebo zlepšení funkčnosti tkání. Cílem je pomocí nanomateriálů vytvořit plně funkční náhradu lidské tkáně.

Princip tkáňového inženýrství spočívá v biopsii tkáně od jedince, izolaci požadovaných buněk a následné kultivaci, během níž se buňky diferencují a prolifерují. Poté jsou buňky osazeny na tkáňový nosič, po určité době určené k adhezi a proliferaci buněk do struktury je materiál připraven k implantaci.

1.1 Tkáňový nosič

Jedním z aspektů tkáňového inženýrství je vývoj 3D nanostruktury, takzvaného scaffoldu (z angličtiny – lešení, zde tkáňový nosič) se specifickými biologickými a mechanickými vlastnostmi přizpůsobenými tak, aby negativně nepůsobily v původním prostředí extracelulární matrix, jejíž funkci má scaffold simulovat. Tento scaffold má sloužit jako dočasná mechanická podpora pro implantované buňky, poskytnout jim vhodné prostředí pro růst a proliferaci. Scaffold také může samotný proces buněčného vývoje podporovat, popřípadě řídit. [1]

1.2 Nároky na scaffold

Ideální tkáňová náhrada by měla být mechanicky stabilní a schopná biologicky působit v místě implantace. Mechanická stabilita implantátu je primárně závislá na druhu biomateriálu, architektuře scaffoldu a vzájemné interakci s materiály okolních buněk. Biologická funkčnost je regulována biologickými procesy okolí. Konstrukce scaffoldu určuje do značné míry funkčnost tkáňové podpory. I když konečné požadavky závisí na konkrétním účelu scaffoldu, musí být splněno několik obecných charakteristik a požadavků, které jsou popsány níže. [2, 3]

Biokompatibilita zahrnuje snášenlivost látek, zejména materiálů v biologickém prostředí. Biokompatibilní materiál se posuzuje podle interakce s prostředím, především

podle cytotoxického působení, podle toxikologických a alergických reakcí, podle karcinogenních, teratogenních či mutagenních reakcí, podle vlivu na infekční procesy. Důležité je, aby materiál neovlivňoval například koagulaci, nevyvolával zánětovou reakci, neuvolňoval potenciálně toxické látky [4]. Biokompatibilita produktů tkáňového inženýrství se týká jejich schopnosti podporovat příslušnou aktivitu, která zahrnuje podporu molekulárním a signálním systémům za účelem optimalizovat regeneraci tkáně. Nesmí při tom docházet k nežádoucím efektům v buňkách a nesmí být vyvolána nežádoucí lokální nebo systémová odezva. [5]

Biodegradabilita je schopnost biologického rozkladu. Biodegradace je proces, při kterém jsou organické látky odbourávány živými organismy. Rozpad materiálu by měl být časově synchronizován s přibližnou dobou růstu daných buněk a remodelací extracelulární matrix. Biologicky rozložitelný materiál by se měl rozkládat do menších netoxických látek bez zásahu do funkčnosti okolní tkáně.

Materiál by měl být vysoce **porézní s propojenými póry**, to souvisí s nutností poskytnout prostor pro vrůstání buněk, vaskularizaci a difúzi živin. [2]

Mechanická pevnost scaffoldu musí být srovnatelná s *in vivo* tkání v místě implantace. Pružnost či tuhost scaffoldu závisí na aplikaci (např. kardiovaskulární systém versus kostní náhrada). [3]

Povrchové vlastnosti materiálu by měly být přizpůsobitelné. Účelem povrchové úpravy materiálu je zlepšení adheze buněk, jejich proliferace a diferenciace, regulace buněčného růstu. Bude usnadněno navázání na vaskularizaci hostitelského systému, aby byl zajištěn transport živin do scaffoldu. [3]

Důležitou roli hraje také **architektura** scaffoldu. Tvar a velikost odpovídá požadavkům dle místa následné aplikace. Topografie povrchu scaffoldu ovlivňuje organizaci tkáně a rozložení buněk, což vede ke zvýšení funkčnosti tkáně.

1.3 Materiály vhodné pro výrobu scaffoldů

Primárním požadavkem na materiály je výše zmíněná biodegradabilita a biokompatibilita. Při procesu výroby je třeba, aby materiály byly formovatelné do různých nepravidelných tvarů odpovídajících požadovanému umístění do tkáně, měly pevnou 3D strukturu. [6]

V současnosti ověřené, a tudíž používané materiály jsou hlavně kyselina polymléčná (PLA), kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA), polykaprolakton (PCL), polyvinylalkohol (PVA), kolagen. [6]

2 Výrobní metody porézních scaffoldů

Je známo mnoho vhodných výrobních technik porézních scaffoldů pro tkáňové inženýrství (Obrázek 1). V této kapitole je stručný přehled principů rozdílných metod se speciálním důrazem na elektrostatické zvlákňování, neboť to je použito jako hlavní výrobní metoda v této diplomové práci.

2.1 Sublimační sušení

V sublimačním sušení neboli anglicky freeze dryingu vede k vytvoření emulze homogenizace systému polymer-rozpouštědlo a vody [7, 8]. Emulze je dvoufázová, kontinuální fáze s dispergovanou fází. Zde kontinuální fáze je polymer, zatímco voda je dispergovaná fáze. Emulze se rychle zmrazí, což vede k ztuhnutí polymeru přímo z kapalného stavu a vytvoření porézní polymerní struktury. Následně se zmrazené rozpouštědlo a voda odstraní lyofilizací (vymrazení, vakuové sušení, mrazová sublimace, voda se odpařuje ze zmrazeného vzorku ve vakuu).

Sublimační sušení je používáno pro vytvoření relativně silných scaffoldů s velkými póry. Navíc během procesu sušení je možné do materiálu začlenit bílkoviny. Výraznou vlastností získané morfologie je, že neprosakuje, má pevné porézní stěny. To je hlavní nevýhoda této metody, jelikož právě to často omezuje buněčný růst a transport živin skrze scaffold.

2.2 Zpěňování

Při zpěňování, z angličtiny foamingu, se obvykle jako zpěňovací element pro vytvoření pórů v polymerech používají rozpustné inertní plyny, např. CO₂ nebo N₂ [9, 10, 11]. Změna procesních podmínek umožňuje řízení vlastností tkáňového nosiče [12]. Tuto metodu lze rovněž použít pro výrobu kompozitu polymeru a keramiky pro použití v náročnějších konstrukcích tkáňového inženýrství [13]. Výhodou této metody je absence rozpouštědla, což eliminuje riziko přítomnosti jeho zbytků ve scaffoldu, a nízká teplota zpracování, jež předchází degradaci polymeru v průběhu zpracování. Na scaffoldu mají často uzavřený povrch a hlavně nepropojené póry, které se stávají

závažnou nevýhodou této metody, protože tyto vlastnosti omezují transport živin dovnitř a skrze lešení. Nicméně v konkrétních případech je možné získat morfologii s otevřenými póry [14, 15, 16], ale velikost pórů je často příliš malá pro aplikace tkáňového inženýrství. Následným působením plazmy nebo pulzním ultrazvukem lze bariéry mezi póry rozbít, póry tak mohou být propojeny [11].

2.3 Vymývání částic

Vymývání částic, používaný je též anglický termín *particle leaching*, se kombinuje s různými technikami, jako je lití rozpouštědla [17, 18] nebo zpěňování [9, 13]. Při vyluhování jsou v materiálu přítomné částice, například sůl, cukr nebo specificky připravené kuličky. Částice jsou rozpuštěné ve vzorku polymeru, po zpracování polymeru do konečné podoby jsou částice vymyty, čímž je vytvořena poréznost v lešení. Největší výhodou této metody je vytvoření scaffoldu s velkými póry, dobře regulovatelná porozita vysoce propojených pórů a morfologie pórů. Nicméně tato metoda není použitelná pro všechny materiály, výroba a následné zpracování mohou být časově náročné s rizikem zbytků částic v materiálu.

2.4 Lití polymeru a fázová separace

K vytvoření scaffoldu je často použito několik výrobních metod založených na lití polymeru, s nebo bez následné separace fází. Metody často používané pro oddělování fází jsou např. fázová separace indukovaná kapalinou (LIPS) [19, 20, 21] a tepelně indukovaná fázová separace (TIPS) [22, 23, 24, 25]. Bez separace fází je ztuhnutí polymeru obecně dosaženo odpařením rozpouštědla [26, 27, 28, 29, 30]. Tyto metody umožňují zpracování jak čistých polymerů, tak kompozitů polymeru a keramiky [31]. Lití polymeru se provádí na formy s mikrovzorem.

Výhodou lití polymeru je možnost vytvořit širokou škálu poréznosti, velikostí pórů a morfologie. Hlavní nevýhoda těchto technik je použití organických rozpouštědel, které mohou zanechat zbytky po zpracování, čímž se scaffold stává nebiokompatibilní. Proto je zásadní účinné promývání scaffoldu před kontaktem s buňkami.

2.5 3D printing

Technologie 3D printing byla vyvinuta na Massachusetts Institute of Technology [32, 33]. V podstatě je 3D printing vrstvený výrobní proces, ve kterém je na podkladovou plochu podle počítačového modelu vytištěn profil na čerstvou vrstvu prášku pomocí depozice vhodným pojivem. Dvojdimenzionální profily jsou pak postupně vytištěny na čerstvě položené vrstvy prášku, dokud není celý tisk modelu dokončen. Vtisknuté pojivo by mělo připojit příslušné profily každé vrstvy dohromady. Struktura je dokončena po odstranění nevázaného prášku a vhodným následným zpracováním [33]. V minulosti byla tato technika používána hlavně pro výrobu systémů dodávání léků [34]. 3D printing, používaný název je také rapid prototyping, je používán opět ve spojení s další metodou, převážně vymýváním částic. Touto technikou je dosažena vysoká porozita s řízenou velikostí pórů.

2.6 Elektrostatické zvlákňování

V procesu elektrostatického zvlákňování (běžně používaný je také anglický termín electrospinning) je využito vysokého napětí k vytvoření elektrické síly, která působí na polymerní roztok. Při překročení kritického napětí dochází k destabilizaci a k vytvoření takzvaných Taylorových kuželů na povrchu roztoku. Z těchto kuželů pak tryská proud elektricky nabitého polymerního roztoku nebo taveniny. Elektroda vysokého napětí je propojena přímo s polymerním roztokem, opačně nabitou elektrodou je v tomto procesu kolektor, na který jsou vlákna zachytávána. Roztok je následně zvlákňován hladinově nebo jehlově, dle použité metody. Princip metody vychází ze zákonů elektrostatiky, jejíž stěžejní rovnicí je Coulombův zákon (Eq. 1), který popisuje sílu, kterou na sebe vzájemně působí dva elektrické náboje q_1 , q_2 ve vzdálenosti r v charakterizovaném prostředí.

$$\vec{F} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2} \frac{\vec{r}}{|\vec{r}|} \quad (\text{Eq. 1})$$

Alternativní formulací Coulombova zákona je Gaussův teorém. Gaussův teorém definuje skalární součin intenzity elektrického pole E a jednotky plochy ds , integrované po uzavřené ploše S , jako náboj uzavřený v určitém povrchu permitivitou ϵ (Eq. 2).

$$\oint_S \vec{E} d\vec{s} = \frac{q}{\epsilon} \quad (\text{Eq. 2})$$

Díky vysokému elektrickému napětí mezi špičkou kapiláry a uzemněným kolektorem vzniká tzv. Taylorův kužel na povrchu roztoku. Taylorův kužel vzniká v případě, že elektrický tlak překoná kapilární tlak $p_e \geq p_c$. Elektrický tlak, který působí na jednotkovou oblast povrchu kapky, je roven síle náboje δq působícího na plochu δS a intenzitě elektrického pole E . Z rovnice o intenzitě elektrického pole na povrchu kapky a Gaussova teorému získáváme vztah pro elektrický tlak p_e (Eq. 3). Kapilární tlak je definován jako součin povrchového napětí látky a součtu dvou hlavních poloměrů křivosti (Eq. 4).

$$p_e = \frac{1}{2} \epsilon E^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$p_c = \gamma(K_1 + K_2) \quad (\text{Eq. 4})$$

Následným zvyšováním elektrického pole je dosaženo kritické hodnoty, při které odpudivá elektrostatická síla překoná kapilární sílu a ze špičky Taylorova kuželu je vypuzen nabitý proud kapaliny. Konkretizujeme-li vztah pro kapilární tlak pro kouli, pak $p_c = 2\gamma/r$. Dáme-li pak do nerovnosti elektrický a kapilární tlak pro kulovou kapku, dostáváme hodnotu kritického náboje na povrchu kapky (Eq. 6), při jejímž překročení dojde k vypuzení kapaliny ve směru elektrického proudu. Intenzita elektrického pole na povrchu kapky (Eq. 5) je odvozena z Gaussova teorému (Eq. 2).

$$\frac{1}{2} \epsilon \left(\frac{Q}{4\pi\epsilon r^2} \right)^2 \geq \frac{2\gamma}{r} \quad (\text{Eq. 5})$$

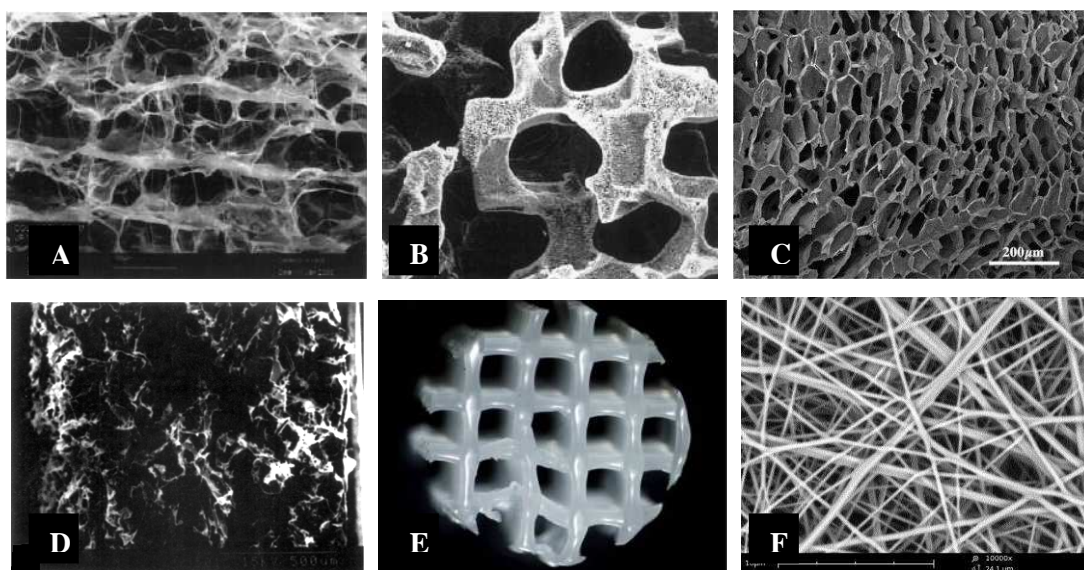
$$Q^2 \geq 64\pi^2 \epsilon \gamma r^3 \quad (\text{Eq. 6})$$

Vytékající proud polymerního roztoku je přitahován ke kolektoru. Než je na kolektoru zachycen, podstoupí nestability a proces prodlužování a bičování, dochází k odpařování rozpouštědla. Vlákna jsou poté zachycena na kolektoru, kde vytvoří vláknennou vrstvu. Za jistých podmínek se kapalinový proud stává nestabilním před dosažením kolektoru. Polymerní kapaliny jsou viskóznější a viskoelastické síly stabilizují proud, což dovoluje formaci nabitých vláken malého průměru, která ztuhnou a uloží se na kolektoru ve formě netkané textilie. [35]

Schopnost polymeru formovat se do vláken je označována jako zvlákňitelnost, což je soubor vlastností ovlivňující tuto schopnost. Běžně užívané rozdělení těchto vlastností je na procesní a systémové parametry.

Mezi procesní charakteristiky ovlivňující tvorbu vláken patří elektrická vodivost a dielektrické vlastnosti polymerního roztoku, intenzita elektrického pole a elektrický proud procesu, vzdálenost kolektoru od zvlákňovací trysky, parametry okolí (teplota, vlhkost).

Systémové parametry jsou především vlastnosti zvlákňovaného polymeru jako molekulová hmotnost, distribuce molekulové hmotnosti, stavba polymeru (rozvětvený, lineární apod.), koncentrace polymerního roztoku, viskozita, hustota, povrchové napětí a viskoelastičita roztoku. Dále také teplota zvlákňování – ta je důležitá zejména při zvlákňování polymerních tavenin, rychlost odpařování rozpouštědla u roztoků a rychlost tuhnutí polymerní taveniny.[35, 36]

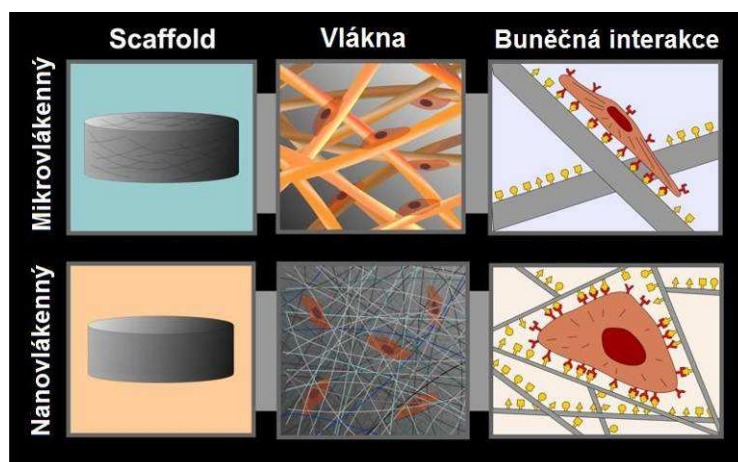


Obrázek 1- Snímky syntetických porézních matric připravených metodou: a) freeze-drying, b) particle leaching, c) phase separation, d) foaming, e) 3D printing, f) electrospinning [37, 38, 39]

3 Elektrostaticky zvlákněné scaffolds

V posledním desetiletí se elektrospinning dostal do popředí zájmu v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Hlavním důvodem je, že elektrostaticky zvlákněná nanovláknenná vrstva významně imituje strukturu přírodní extracelulární matrix (ECM) v lidském těle. [40]

Přirozená struktura lidské tkáně je složena ze specifických buněk a ECM fibril (vláknenné útvary z lineárních makromolekul, obvykle bílkovinné). To vede k nutnosti vývoje biomimetického scaffoldu, který by účinně vyživoval buňky, odváděl odpadní látky. Scaffold by měl být schopen vaskularizace, tkáň by měla prorůstat skrze celou strukturu. Jelikož buňky a fibrily, ze kterých je složen lidský organismus, jsou v nanorozměrech (viz Kapitola 4), pro adhezi a vývoj je nutné poskytnout prostředí co nejpřesněji imitující přirozené prostředí organismu. Z toho plyne nutnost vývoje prostředí v nanorozměrech (Obrázek 2).



Obrázek 2– Buněčná adheze na nanovláknenný a mikrovlákenný scaffold [41]

3.1 Výhody elektrostaticky zvlákněných scaffoldů

Nanovláknenné vrstvy mohou být vyrobeny z širokého spektra organických polymerů rozdílných vlastností, čímž jsou vrstvy přizpůsobené pro různé aplikace. Tyto scaffolds vyrobené metodou elektrostatického zvláknění vynikají velkým specifickým povrchem, což je důležité pro buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci. Další výhodou je, že mechanické a chemické vlastnosti tohoto scaffoldu mohou být

efektivně modifikovány, například aditivou či povrchovou úpravou. Výsledné scaffoldy z nanovláken mají póry v nanoměřítku, ale velikost pórů může být kontrolována dalšími metodami, jako vymýváním částic či použitím speciálních kolektorů pro specifické ukládání vláken. Nízké teploty prostředí při elektrostatickém zvlákňování umožňují mísení složek citlivých na teplotu jako léky, biologické materiály. [42]

3.2 Parametry elektrostaticky zvlákňovaných scaffoldů

V minulosti byla velikou nevýhodou nízká produkce vláken z laboratorních zařízení. To bylo v roce 2006 vyřešeno patentem Technické univerzity v Liberci. Průmyslový stroj na výrobu nanovláken metodou hladinového zvlákňování Nanospider, který je vyráběn společností Elmarco, je schopen vyrobit 1-5 g/min na 1 m pracovní šířky v porovnání s laboratorními technikami, jejichž výkonnost je 0,1 g/min na 1 metr pracovní šířky. Laboratorní techniky jsou v tomto případě elektrostatické zvlákňování z jehly či hladinové zvlákňování na laboratorních aparaturách.

Nevýhodou je nebezpečí při procesu výroby, jelikož se pracuje s vysokým napětím v řádu desítek kilovoltů, popřípadě působení vypařovaných rozpouštědel negativně působících na životní prostředí i lidský organismus.

Významným rizikem, které se prozatím nedaří specifikovat, je působení nanomateriálů a nanočástic na lidský organismus. [43]

4 Úvod do buněčné biologie

Buňka je základní strukturální a funkční jednotkou všech živých organismů, a to jednobuněčných i mnohobuněčných. Existují dva základní morfologicky odlišné typy buněk – prokaryotické a eukaryotické.

Prokaryotické buňky tvoří obvykle malé jednobuněčné organismy, například bakterie. Tyto buňky nemají vyvinutý jaderný obal, který odděluje genetický materiál (DNA) od dalších složek. V intracelulárním prostředí nemají vyvinuty membránou ohraničené organely. Prokaryotické buňky měří průměrně 5 μm .

Buňky eukaryotické jsou obvykle větší, jádro s genetickou informací je odděleno jaderným obalem od cytoplasmy. V cytoplasmě se vyskytují četné organely ohraničené membránou. Eukaryotické buňky primárně existují jako jednotky mnohobuněčných organismů.

Protože dílčím předmětem této diplomové práce je tkáňové inženýrství, budu se dále zabývat výhradně buňkou eukaryotickou. [44, 45]

4.1 Buněčná stavba

Celkový náhled na stavbu eukaryotické buňky poskytuje Obrázek 3. Obsah buňky uvnitř buněčné membrány se nazývá protoplasma. Protoplasma je metabolicky aktivní, živá část obsahu buňky. Protoplasmu lze popsat jako dvě části – karyoplasmu a cytoplasmu.

Buněčnou **cytoplasmu** charakterizujeme jako živou hmotu uvnitř buňky kromě jádra. Od okolního prostředí je oddělena buněčnou cytoplasmatickou membránou. Tato membrána slouží jako mechanická opora, zprostředkovává výměnu látek a informací mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím. Cytoplasma je tvořena buněčnou matrix (cytosol), v níž jsou obsaženy buněčné organely, elementy cytoskeletu a inkluse.

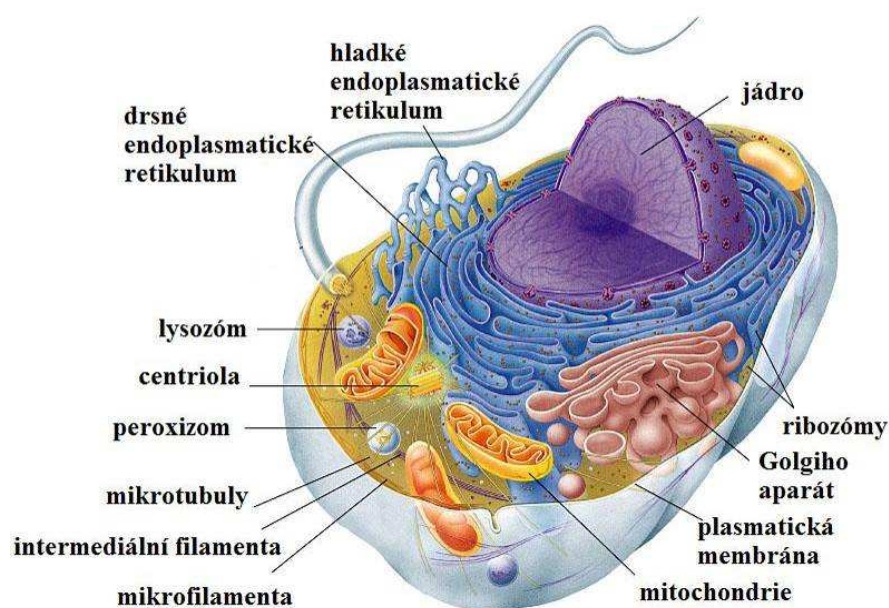
Organely jsou membránou ohraničené subcelulární struktury, které obsahují enzymy, jež participují na metabolických pochodech buňky. Každá organela má charakteristickou strukturu a funkci (viz Tabulka 1).

Cytoskelet je dynamická transportní a opěrná síť. Elementy cytoskeletu jsou mikrofilamenta, intermediální filamenta a mikrotubuly. Jsou to proteinová vlákna

s průměrem 5 - 24 nm, dle typu. Poskytují strukturální stabilitu pro udržení tvaru buňky, podílí se na buněčném pohybu a cytoplasmatickém transportu.

Cytoplasmatické inkluze nejsou permanentní komponenty buňky, jsou méně aktivně zapojeny do metabolismu buňky než organely. Jsou to například tukové kapénky.

Karyoplasma je organizována v jádro. Jádro je centrálním orgánem buňky. Obsahuje lineární kód DNA pro syntézu součástí buňky a jejích produktů. Jádro je nezbytné pro reprodukci buňky, buněčnou diferenciaci. [44, 45]



Obrázek 3 – Eukaryotická buňka (Copyright 2003, Pearson Education, Inc.) [60]

Tabulka 1 – Organely eukaryotické buňky [44, 45]

Organela	Struktura	Funkce
<i>Mitochondrie</i>	Sférický nebo vláknitý tvar, Průměr 0,2 µm, délka 2 -6 µm	Skladování energie ve formě ATP, energie pro chemickou a mechanickou práci
<i>Ribozomy</i>	Velikost 25 nm, složeny z ribozomální RNA a proteinů	Syntéza aminokyselin do proteinů, proteiny a enzymy pro nitrobuněčnou potřebu
<i>Endoplasmatické retikulum drsné</i>	Sít' membrán v podobě cisteren, paralelně uspořádány, na povrchu ribozomy	Syntéza kolagenu, proteinů určených k zabudování do buněčných membrán, lysozomální enzymy
<i>Endoplasmatické retikulum hladké</i>	Hladké tubulární cisterny	Metabolismus lipidů, syntéza steroidních hormonů, štěpení glykogenu, detoxikace
<i>Golgiho aparát</i>	Složen z membrán	Syntéza polysacharidů, úprava, třídění, skladování sekrečních produktů
<i>Lysozomy</i>	Sférické vezikuly	Obsahují až 50 enzymů, buněčný „trávicí systém“
<i>Peroxisomy</i>	Membránou ohraničené vezikuly, větší než lysozomy	Metabolismus peroxidu vodíku, podíl na glukogenezi
<i>Centrioly</i>	Válec z mikrotubulů, průměr 150 nm, délka 350 – 500 nm	Organizace buněčné struktury, transport organel v buňce, vznik bazálních tělísek

4.2 Morfologie buněk

Během ontogenetického vývoje dochází k procesu buněčné diferenciace. Buněčná diferenciace je funkční a tvarová specializace buňky dle umístění a požadované funkce. Velikost buněk je také různá, kolísá mezi 4 µm - 150 µm. Přehled velikosti vybraných buněčných typů shrnuje Tabulka 2. V lidském organismu existuje okolo 200 typů různě terminálně diferencovaných buněk.

Jednotlivé buňky v organismu spolupracují, tím vytvářejí funkční soubor nazývaný tkáň. Podle obsahu buněk a buněčných produktů jsou stanoveny základní typy tkání – tkáň epitelová, pojivová, svalová a nervová. [44, 45]

Tabulka 2 – Příklady buněk lidského organismu s charakterizovanou velikostí [44, 45]

Buňka	Výskyt	Velikost
<i>Adipocyt</i>	Tuková tkáň	50 – 100 μm
<i>Epitelová buňka</i>	Zevní a vnitřní povrch orgánů	10 – 20 μm
<i>Erytrocyt</i>	Krev	7,5 x 2,6 μm
<i>Fibroblast</i>	Vazivová tkáň, ECM	10 – 15 μm
<i>Heparinocyt</i>	Vazivová tkáň	20 – 30 μm
<i>Hepatocyt</i>	Játra	25 – 30 μm
<i>Chondrocyt</i>	Hyalinní chrupavka, kloubní povrchy	10 – 30 μm
<i>Kardiomyocyt</i>	Srdeční svalovina	15 – 20 μm , délka až 100 μm
<i>Leukocyt</i>	Krev	10 – 15 μm dle typu
<i>Makrofág</i>	Vazivová tkáň, imunitní reakce	10 – 30 μm
<i>Myocyt</i>	Hladká svalovina	6 μm , délka 20 μm
<i>Neuron</i>	Nervová tkáň	4 – 150 μm , axon až 100 cm
<i>Oocyt</i>	Ženský pohlavní systém, vajíčko	150 μm
<i>Pneumocyt I. typu</i>	Plicní tkáň	4 – 6 μm
<i>Spermie</i>	Mužský pohlavní systém	48 μm
<i>Trombocyt</i>	Krev	2 – 5 μm

4.3 Buněčná adheze

Na adhezi buněk závisí přímo nebo nepřímo mnoho jejich funkcí, zejména ty, které zajišťují celistvost tkání a buněčný tvar. Vzájemná adheze vyžaduje spojení mezi cytoskeletem sousedních buněk. Intercelulární vazby jsou zprostředkovány transmembránovými proteiny nazývanými cadheriny.

Adheze buňky k substrátu zahrnuje vazbu mezi cytoskeletem a kolagenními vlákny uloženými v extracelulární matrix. Transmembránové proteiny těchto adhezí se nazývají integriny. [44, 45]

4.4 Mezibuněčná hmota

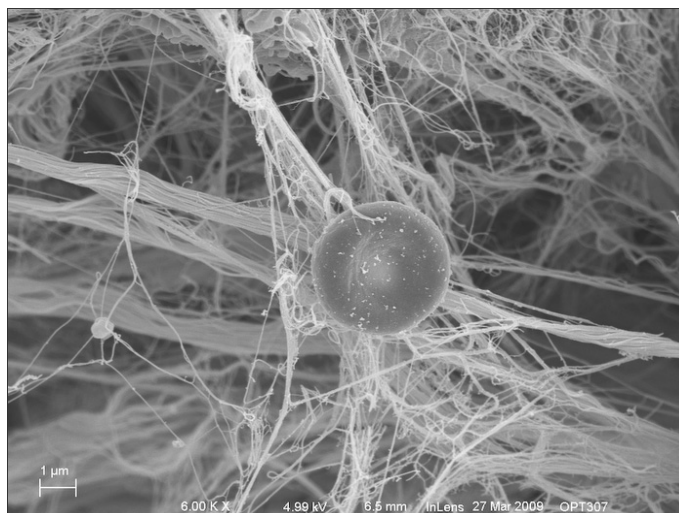
Mezibuněčná hmota neboli extracelulární matrix (Obrázek 4) je kategorizována do pojivových tkání. Její funkcí je spojování ostatních tkání, strukturální opora, kompartmentalizace, fyzikální a imunologická ochrana, kumulace zásobních látek.

Extracelulární matrix je tvořena třemi základními prvky – buňkami, vlákny a základní hmotou.

Vlákna jsou dvou typů, kolagenní (z proteinu kolagenu) a elastická (z proteinu elastinu). Kolagenní vlákna tvoří svazky, jejichž průměr je od 0,5 μm do 15 μm . Nejvýznamnější mechanickou vlastností těchto vláken je pevnost v tahu, jež je při totožné hmotnosti větší než pevnost ocele. Elastická vlákna měří v průměru 0,1 μm až 10 μm . Tato vlákna se mohou natáhnout až na 150 % své délky a pak se vrátit do původní velikosti, bez přerušení své struktury.

Hmota, ve které se buňky a vlákna vyskytují, se skládá především z glykosaminoglykanů (lineární polysacharidy) rozpuštěných v tkáňové tekutině. Viskozita a pevnost extracelulární matrix je dána množstvím a charakterem vazeb mezi jednotlivými složkami. Všechny součásti vláken a základní hmoty jsou syntetizovány buňkami fibroblasty, méně aktivně i fibrocyty. Vlákna jsou sestavována v extracelulárním prostoru.

Fibroblasty se ve vazivu nacházejí nejčastěji. Tyto buňky vykazují výraznou syntetickou aktivitu, udržují základní složky mezibuněčné hmoty. Fibroblast má protáhlý, hvězdicovitý tvar s dlouhými cytoplazmatickými výběžky a velkým jádrem. [44, 45]



Obrázek 4 – Erytrocyt v prostředí ECM (měřítko v levém rohu odpovídá 1 μm) [61]

5 Vliv porozity a velikosti pórů scaffoldu na buněčnou proliferaci

Současný vývoj scaffoldů je soustředěn na tři významné parametry – zvětšování mezivláknenných pórů, zvyšování porozity materiálu a vývoj 3D struktury. Porozita určuje procentuální část scaffoldu dostupnou pro růst buněk. Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy vykazují porozitu větší než 70 %, čímž jsou vhodným kandidátem pro využití v tkáňovém inženýrství.

Nanovláknenná vrstva vyniká malými průměry vláken, s nimiž souvisí i velmi malé mezivláknenné póry. Problémem, jež má v tkáňovém inženýrství zvláštní význam, je právě velikost těchto pórů a využití a dostupnost celého prostoru matrice. Jelikož rozměry buněk vyskytujících se v lidském organismu se pohybují v rozmezí 10 μm – 100 μm (viz Tabulka 2), je nutné poskytnout jim vhodnou velikost pórů pro jejich vlastní proliferaci, dále je třeba zajistit prostor ve scaffoldu pro vaskularizaci a metabolickou aktivitu buněk. Pokud nejsou póry mezi vlákny dostatečně velké, buňky se rozrůstají pouze na povrchu materiálu, místo toho, aby se zachytávaly i na přístupná vlákna hlouběji ve struktuře a tím byly penetrovány do celého objemu třídimenzionálního prostředí.

5.1 Pěnové scaffoldy pro tkáňové inženýrství

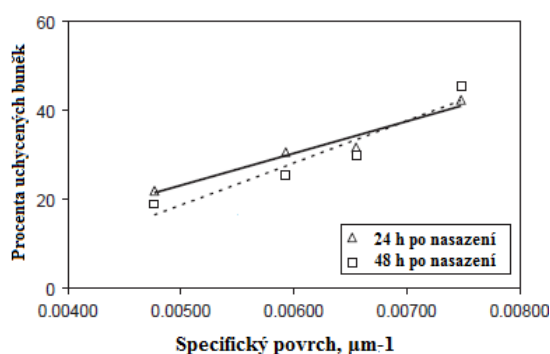
Pěnové scaffoldy vyrobené metodami vyluhováním částic, sublimačním sušením či zpěňováním mají obecně výraznou 3D strukturu, jež se dá při výrobě efektivně ovlivňovat použitím příslušné formy, čímž splňují požadavek prostorově kontrolovatelné matrice. Níže popsané studie se věnovaly změnou velikosti pórů v pěnovém scaffoldu a vlivem jejich velikosti na buněčnou aktivitu a proliferaci v *in vitro* prostředí.

O'Brian a kol. [46] se zabývali vlivem velikosti pórů a specifického povrchu na buněčnou adhezi. Scaffoldy připravovali metodou freeze drying. Materiálem scaffoldů byla suspenze kolagenu I. typu a glykosaminoglykanu. Při vysušování mrazem bylo použito různé konečné teploty T_f (-10°C, -20°C, -30°C, -40°C) k dosažení rozdílných

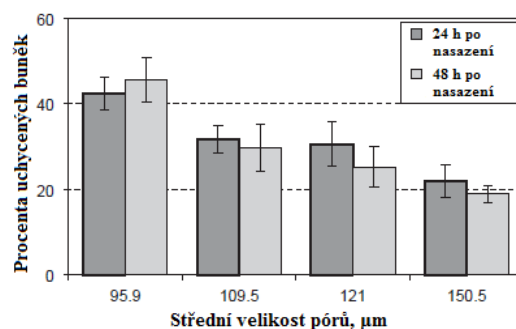
pórů středních hodnot 150,5 μm , 121 μm , 109,5 μm , 95,9 μm . Pro testování byly použity buňky myší fibroblasty značené MC3T3.

Na scaffold s nejmenším póry se ($T_f = -40^\circ\text{C}$) se aktivně přichytilo přes 40 % nasazených buněk a buňky byla viabilní po 48 hodinách. Naproti tomu na scaffoldu s největšími póry zůstalo za stejných procesních podmínek adherováno pouze 20 % vysazených buněk (Obrázek 6).

Vztah mezi specifickým povrchem scaffoldu a procenty uchycených buněk v časovém úseku 48 hodin ukazuje Obrázek 5. Je zde patrná lineární závislost těchto dvou parametrů. Z této studie vyplývá, že u pěnových materiálů ve srovnání s vláknennými jsou póry mnohem větší, což není pozitivní pro buněčnou adhezi. Se zvyšováním velikosti pórů počet adherovaných buněk klesá.



Obrázek 6 – Závislost uchycení buněk na specifickém povrchu scaffoldu po 24 h a 48 h od nasazení buněk [46]



Obrázek 5 - Procentuální uchycení buněk na CG scaffoldech po 24 h a 48 h od nasazení buněk [46]

V protikladu k tomu, *Karageorgious a kol.* [47] dokázali, že optimální rozměr dutin ve scaffoldu pro růst kostní tkáně připraveném metodou zpěňování, je větší než 300 μm . Nicméně, jak autoři upozorňují, nebyla zkoumána maximální vhodná velikost pórů, při které by mohl nastat problém, že buňky nebudou schopny prostor přemostit a tím se šířit dále.

5.2 Význam pěnových scaffoldů pro tkáňové inženýrství

U pěnových scaffoldů je tedy možné dosáhnout výrazně větších pórů než u elektrostaticky zvlákněných scaffoldů (viz Kapitola 5.3). Nicméně zvyšování velikosti

pórů nevede vždy k pozitivnímu ovlivnění buněčné aktivity. Zmíněné studie dokazují, že záleží na typu tkáně, pro kterou je scaffold určen.

5.3 Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy pro tkáňové inženýrství

Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy mají většinou spíše charakter vrstvy. I přes výraznou snahu vyrobit 3D nanovláknenný scaffold bývá jeden rozměr více či méně potlačen. Velikosti pórů vznikajících v nano- či mikrovláknenné vrstvě korespondují s průměry vláken, nepodařilo se tedy prozatím vyrobit vláknenný scaffold s velikostí pórů v řádech desítek či stovek mikrometrů jako u pěnových scaffoldů.

Níže popsané studie se věnují vhodnosti různých materiálů a aditiv, které by mohly případně zlepšit buněčnou aktivitu, pro výrobu nano- a mikrovláknenných scaffoldů elektrostatickým zvlákněním. Jsou diskutovány různé velikosti vláken a pórů a vliv těchto parametrů na buněčnou adhezi a proliferaci v *in vitro* prostředí.

Lowery a kol. [48] zkoumali vliv průměru pórů vláknenné struktury na růst buněk, konkrétně lidských dermálních fibroblastů. Jako materiál pro scaffold používali polykaprolakton (PCL, $M_m = 80\,000$). Nejprve elektrostaticky zvláknili PCL a polyethylenoxid (PEO, $M_m = 100\,000$) v různých poměrech, poté byl PEO vymýván ze scaffoldu po dobu sedmi dnů a scaffold byl vysušen. Ze vzorků tak bylo odstraněno až 98 % celkového obsahu PEO. Parametry zkoumaných scaffoldů ukazuje Tabulka 3.

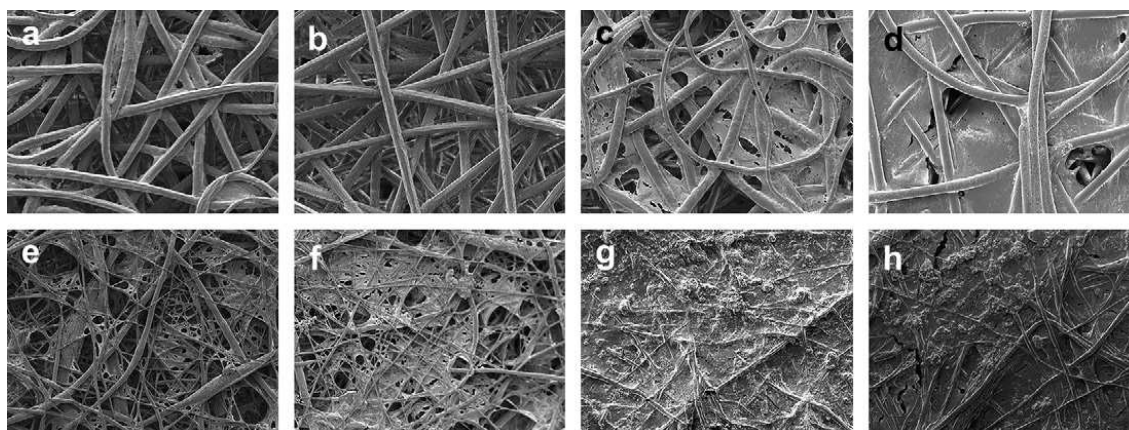
Nejlepší růst buněk po 21 dnech byl zaznamenán na scaffoldech S1, S2 a S4. Ty ve zkoumaném celku představují skupinu s největšími průměry vláken a mezivláknenných pórů. Scaffold S7, který je charakterizován nejmenším průměrem vláken a nejmenším průměrem pórů, vykazoval nejmenší buněčný nárůst po 21 dnech. Přítomnost ECM byla zaznamenána prakticky okamžitě u scaffoldů s průměrem pórů menším než 15 μm (S2, S3). Naproti tomu u vzorku S1 nebyl vznik ECM prokázán až do 14. dne od zahájení kultivace. To poukazuje na nutnost vymezení horní hranice velikosti pórů, za kterou již nedochází k přemostění vláken buňkami a tvorbě ECM.

Tabulka 3 – Charakteristika vybraných scaffoldů zkoumaných Lowery a kol. [48]

Vzorek	Materiál	Průměr vláken [μm]	Průměr pórů [μm] – nejvíce zastoupen	Průměrná velikost pórů [μm]	Porozita [%]
S1	PCL 10 hm%	8,32 ± 0,72	23,4	36,4 ± 17,7	87,02
S2	PCL 11 hm%	2,50 ± 0,32	6,5	13,9 ± 8,0	86,52
S3	PCL 6 hm%	0,73 ± 0,09	9,3	18,3 ± 10,8	76,70
S4	PCL/PEO 3 hm%/8 hm%	7,93 ± 4,99	12	19,6 ± 14,5	65,70
S7	PCL/PEO 1 hm%/0,3 hm%	0,91 ± 0,21	0,16	0,72 ± 0,54	63,86

K jasnému přemostění mezi vlákny došlo na povrchu vzorku S2, zatímco na povrchu vzorku S1 se buňky rozrůstaly spíše podél vláken (Obrázek 7). Bylo prokázáno až o 90 % méně buněk na povrchu vzorku s průměrem pórů větším než 15 μm (S1) v porovnání se scaffoldy s menšími póry (S2, S4), ale celkový počet buněk vzorků S1, S2, S4 byl srovnatelný. Z toho plyne, že u vzorku S1 se buňky lépe infiltrovaly do objemu materiálu. Celkový počet živých buněk byl mnohem vyšší u scaffoldů s póry většími než 6 μm.

Výsledkem této studie bylo, že snižování velikosti pórů scaffoldu vede k uchycování a rozrůstání buněk spíše po povrchu materiálu, zatímco u větších pórů dochází k penetraci buněk do objemu, ale vede to k růstu buněk podél jednotlivých vláken. Optimální průměr pórů vlákenné struktury je v této studii stanoven na 6 μm – 20 μm.



Obrázek 7 – Buněčná aktivita a tvorba ECM v 1., 7., 14. a 21. dnu od osazení scaffoldu S1 (a-d), S2 (e-h) buňkami. Vyobrazení SEM. [48]

J. Rnjak-Kovacina a kol. [49] svůj výzkum zaměřili na řízení porozity a velikosti pórů elektrostaticky zvlákněného syntetického lidského elastinu (SHE). Byli vyrobeny scaffoldy s vyšší a nižší porozitou použitím rozdílného průtoku roztoku tryskou při jehlovém zvláknění, průtok byl 1 ml/h a 3 ml/h. Zvlákněvaný materiál byl 20hm% roztok tropoelastinu rozpuštěný 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolu.

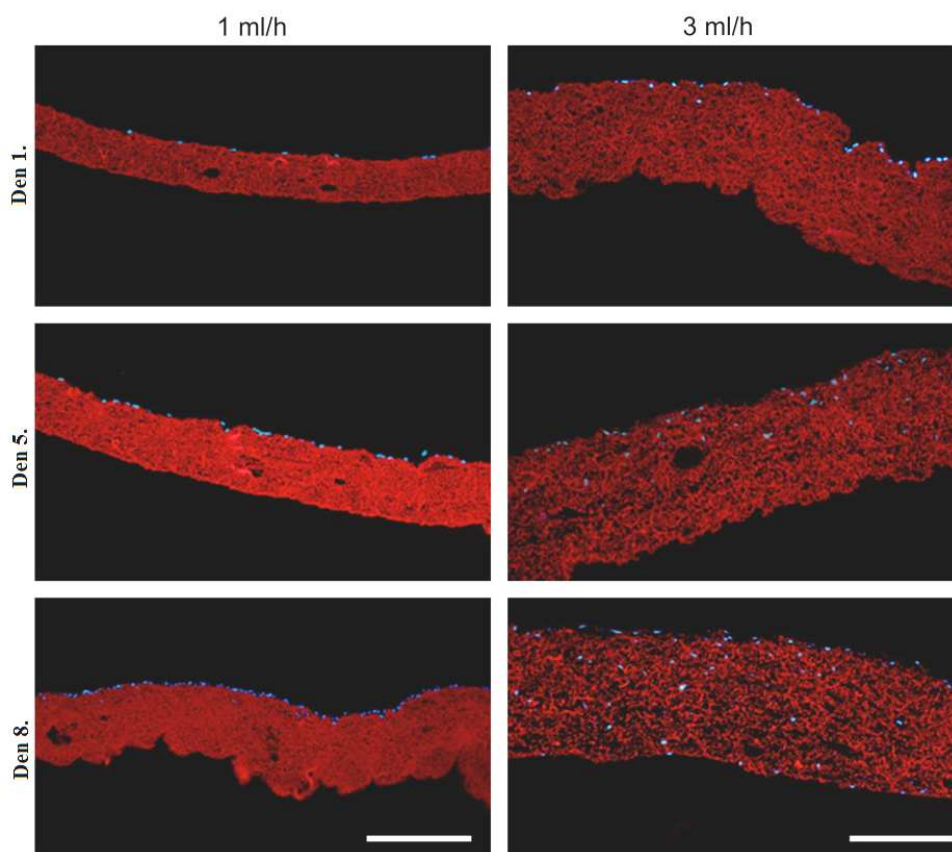
Při vyšším průtoku roztoku jehlou při zvláknění byl vyroben scaffold vykazující vyšší porozitu a větší póry, menší hustotu vláken (označme SC2), než scaffold vyrobený při nižším průtoku roztoku jehlou (označme SC1). Vlastnosti scaffoldů SC1 a SC2 shrnuje Tabulka 4. Oba scaffoldy dosahují Youngova modulu srovnatelného s přírodním elastinem, ale SC2 vykazuje vyšší pevnost v tahu.

Tabulka 4 – Vlastnost scaffoldů SC1, SC2 [49]

Scaffold	Průtok roztoku jehlou [ml/h]	Průměr vláken – stř. velikost [μm]	Porozita [%]	Průměr pórů – stř. velikost [μm]
SC1	1	$2,3 \pm 0,5$	$14,5 \pm 0,8$	$8,0 \pm 0,2$
SC2	3	$3,2 \pm 1$	$34,4 \pm 1,3$	$11,7 \pm 0,1$

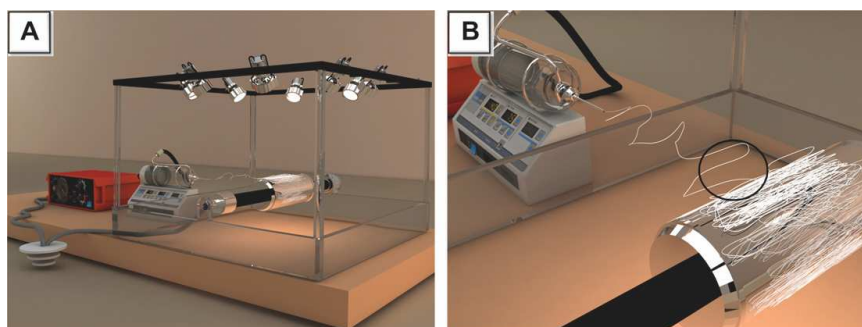
Na scaffoldy byly nasazeny lidské dermální fibroblasty. Buňky se uchytily a začaly se šířit podél vláken asi 30 minut po nasazení, v obou případech se počet buněk během zkoumané doby 8 dní zvyšoval. Na SC1 se buňky po evidovaný čas šířily spíše po povrchu scaffoldu, v případě vysoce porézního SC2 se buňky po 3 dnech od nasazení nacházely v polovině šířky scaffoldu a po 8. dni buňky dosáhly druhého neosazeného povrchu scaffoldu (Obrázek 8).

SC2 byl pak sledován v delším časovém rozpětí a bylo vypořádováno, že od 14. dne po nasazení fibroblasty produkují ECM proteiny kolagen I a fibronectin. Tento scaffold byl implantován do podkoží myši. Byla pozorována degradace a remodelace scaffoldu v *in vivo* prostředí, konkrétně tvorba kolagenu a počáteční stádium angiogeneze.



Obrázek 8 – Migrace a proliferace lidských dermálních fibroblastů na SHE scaffoldy SC1 a SC2 v průběhu 8 dnů. Fibroblasty zbarveny modře. Měřítko 200 μm . [49]

I. Shabani a kol. [50] se pokusili vyrobit vysoce porézní 3D scaffold modifikací procesu elektrosponingu. Zvlákňovacím materiálem scaffoldů byl 12hm% roztok PLLA rozpuštěný v dichlormethanu/dichlormethylformamidu. Zvlákňování probíhalo z jehly. Tento klasický proces modifikovali lokalizovaným teplem produkovaným halogenovými žárovkami fokusovanými na poslední třetinu vzdálenosti mezi hrotem jehly a kolektorem (Obrázek 9), spektrum těchto lamp obsahovalo vlnové délky viditelného a infračerveného světla. Tím došlo k prudkému odpaření rozpouštědla v poslední fázi jetu, což vedlo ke snížení vzájemné přilnavosti vláken. Během zvlákňování byl vzduch v okolí aparatury cirkulován, aby byly zachovány konstantní podmínky během celého procesu. K porovnání byla vyrobena nanovláknenná vrstva za stejných podmínek bez přidání halogenových žárovek. Makroskopické zobrazení obou vrstev je na Obrázek 10. Vliv fokusovaného tepla na polymerní trysku je zřejmý.



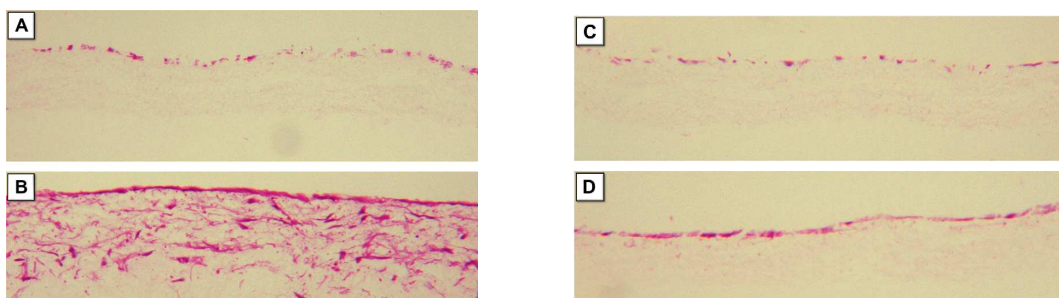
Obrázek 9 – Systém „light emission array“ elektrospinningu. A – celá aparatura, B – fokusace světla na poslední třetinu jetu v blízkosti kolektoru. [50]



Obrázek 10 – Makroskopický snímek vrstev vyrobených konvenčním (vlevo) a modifikovaným elektrospinningem (vpravo). [50]

Charakterizací vrstev bylo zjištěno, že nejsou signifikantní rozdíly ve velikosti pórů na povrchu obou scaffoldů. Tato studie se zabývá vlivem hustoty vláken na buněčnou penetraci, velikosti vláken a pórů zde nejsou uvedeny.

Na scaffoldy byly nasazeny kmenové buňky. Po 14 dnech od nasazení byla na scaffoldu vyrobeném modifikovaným elektrospinningem patrná lepší infiltrace buněk skrz povrchovou vrstvu do objemu materiálu. To bylo také potvrzeno pozorováním histologicky zbarvených tenkých příčných řezů (Obrázek 11).

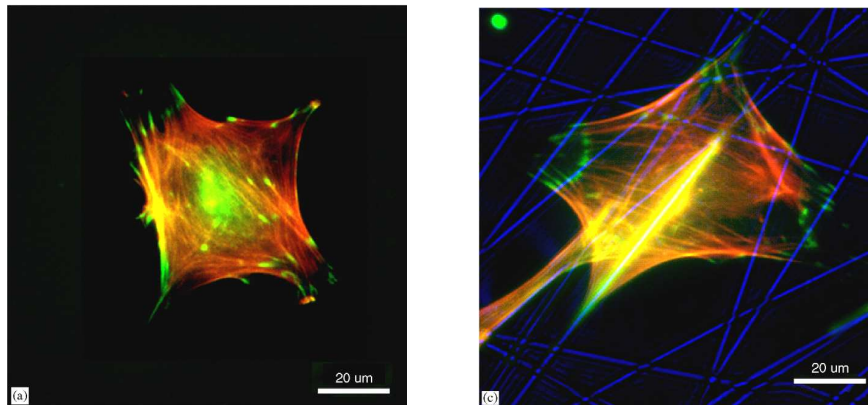


Obrázek 11 – Snímky příčných řezů scaffoldů osazených kmenovými buňkami po 1 dni (A, C) a 14 dnech (B, D) kultivace. A a B je scaffold vyrobený modifikovaným elektrospinningem, C a D je scaffold vyrobený konvenčním elektrospinningem. [50]

A. S. Badami a kol. [51] se zaměřili na vliv průměru vláken na šíření, proliferaci a diferenciaci osteoblastů elektrostaticky zvlákněného scaffoldu ze substrátů kyseliny polymléčné. Scaffoldy byly zvlákněné ze substrátů kyseliny polymléčné a polyethylenglykolu - PLLA, PDLLA, PEG-PLLA, PEG-PDLLA. Bylo dosaženo rozdílných průměrů vláken v rozpětí 2,14 μm až 0,141 μm . Ze stejných materiálů byly také vyrobeny hladké vrstvy. Scaffoldy byly osazeny myšími fibroblasty MC3T3 a sledovány po dobu 2 týdnů.

Bylo zjištěno, že monopolymerní ani homopolymerní vlákna během 14 dnů nepodléhají degradaci ani delaminaci. Bylo prokázáno, že za přítomnosti osteogenních faktorů byla hustota buněk větší na vlákenné vrstvě než na hladkém povrchu, hustota buněk rostla s větším průměrem vláken. Na vláknech o větších průměrech (PDLLA, PEG-PDLLA) se buňky uchytily a rozprostřely své lamely podél vlákna, měly menší plochu a jiný poměr stran než na rovném povrchu (Obrázek 12).

Tato studie dokazuje, že rozdílná topografie povrchu, zde zastoupena hladkou vrstvou a vlákny s rozdílnými průměry, má vliv na buněčnou proliferaci a morfologii buňky.



Obrázek 12 – Imonufluorescenční zabarvení adherovaných buněk. Hladký povrch PDLLA (vlevo) a PDLLA nanovlákna průměru 2,1 μm (vpravo). [51]

W. A. R. Neto a kol. [52] soustředili svůj výzkum na vliv mikrostruktury a mechanické pevnosti nanovláken z biodegradabilních polymerů s příměsí hydroxyapatitu (zde značeno HA) na buněčný růst. Jako výchozí polymery byly zvoleny PCL ($M_m = 80\,000$) a PLA ($M_m = 112\,000$). Rozdíl mezi vlastnostmi těchto polymerů je, mimo jiné, že PCL je více hydrofobní než PLA. Doba degradace materiálů

je také rozdílná, PCL ztratí 1 % své váhy za 26 týdnů, zatímco PLA za stejných konstantních podmínek degraduje mnohem rychleji, ztrácí 16 % své váhy za stejný časový interval.

Použití HA do vláken bylo již zkoumáno. Bylo zjištěno, že přidání malého množství HA zpevňuje nanovlákná, zatímco přidáním příliš velkého množství mohou být způsobeny defekty vláken, je snížena elasticita vláken. [53]

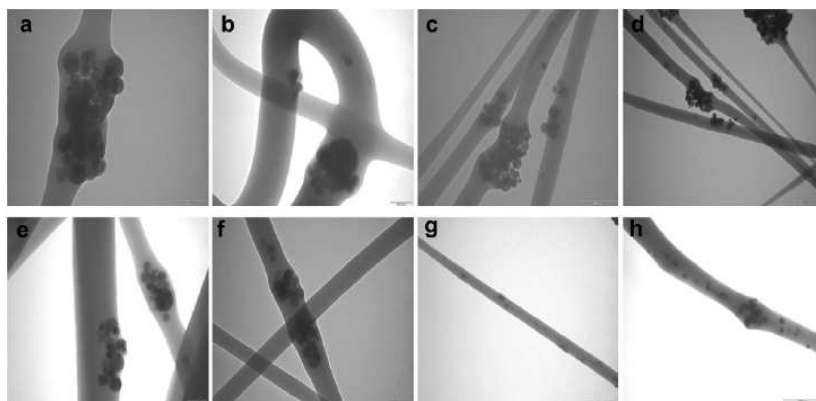
HA použitý v této studii byl nanohydroxyapatit (nHA), jehož čistota byla větší než 97 % a specifický povrch $9,4 \text{ m}^2/\text{g}$. Data jsou dle dodavatele Sigma-Aldrich. Jako rozpouštědlo PLA byl použit nejprve chloroform, následně dimethylformamid. PCL byl rozpuštěn v nejprve také v chloroformu, poté v methanolu. Výsledn koncentrace polymerů byly 7% PVA a 12% PCL. HA byl přidán v koncentracích 1 % a 5 %. Vzniklo tak 6 různých roztoků – PLA 7%, PLA-nHA 1%, PLA-nHA 5%, PCL 12%, PCL-nHA 1%, PCL-nHA 5%.

Roztoky byly elektrostaticky zvlákněny při různých aplikovaných napětích, charakteristika nanovláknenných vrstev prezentuje Tabulka 5.

Tabulka 5 – Průměry nanovláken [52]

Aplikované napětí (kV)	Průměrná šířka vláken (nm)					
	PLA 7%	PLA-nHA 1%	PLA-nHA 5%	PCL 12%	PCL-nHA 1%	PCL-nHA 5%
9	367 ± 86	253 ± 86	212 ± 53	368 ± 103	333 ± 123	237 ± 124
12	339 ± 120	362 ± 86	340 ± 100	340 ± 71	251 ± 104	230 ± 91
15	357 ± 114	344 ± 106	353 ± 88	368 ± 118	273 ± 103	215 ± 97

Z tabulky je patrné, že při daném napětí jsou průměry vláken čistých polymerů velmi podobné. Aplikované napětí a příměs nHA minimálně ovlivňuje průměry zniklých vláken, ale s nelineární závislostí. Linearita vlivu napětí na průměry vláken je patrná pouze u vzorků s nejvyšším procentem nHA. Snímky z transmisního elektronového mikroskopu znázorňují strukturu nanovláken s částicemi nHA (Obrázek 13).



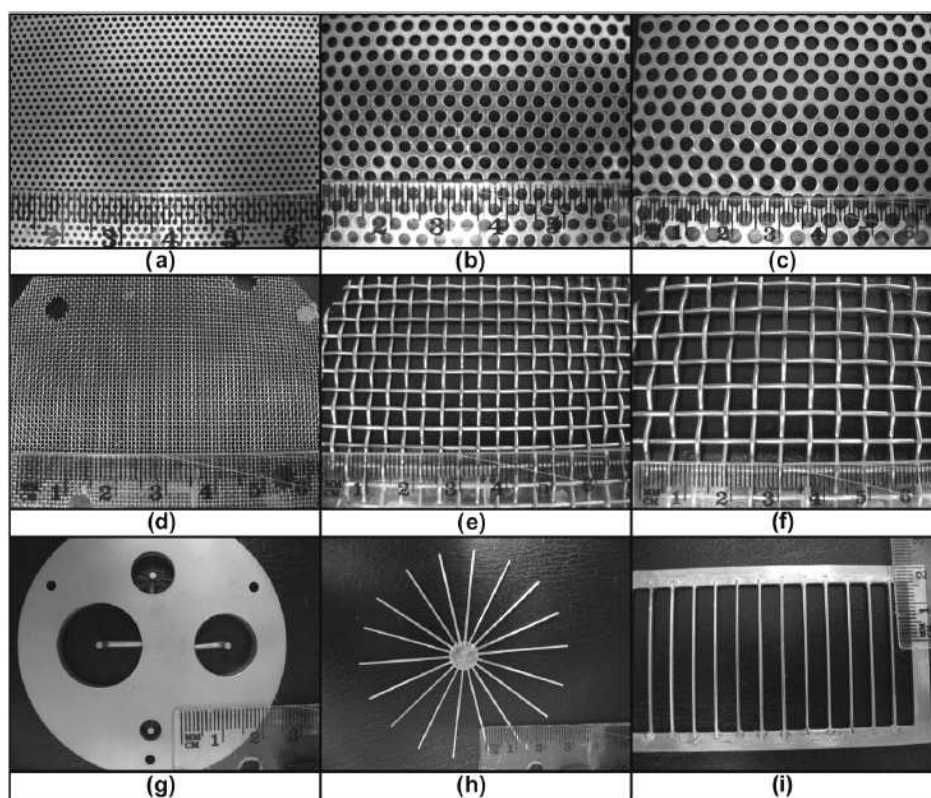
Obrázek 13 – TEM snímky nanovláken : *a, b* – PLA-nHA 1%, *c, d* – PLA-nHA 5%,
e, f – PCL-nHA 1%, *g, h* – PCL-nHA 5%. [52]

Testem viability tukových kmenových buněk h-ASC bylo zjištěno, že největší počet přeživších buněk po 7 dnech od nasazení se vyskytoval na scaffoldu PLA-nHA 5% zvlákněném při 15 kV. Hodnota modulu pružnosti tohoto scaffoldu byla stanovena na 83,67 MPa.

Z PCL scaffoldů nejlepší podmínky pro růst buněk prokázal scaffold PCL-nHA 5% zvlákněný při 12 kV. Modul pružnosti tohoto scaffoldu byl 30,1 MPa.

Tato studie prokazuje, že pro nejefektivnější viabilitu a adhezi buněk na materiál je vhodný vysoce hydrofilní scaffold s vyšším podílem nHA, vysokým modulem pružnosti a nízkou krystalinitou.

Přehledový článek, který se zabývá zvětšováním pórů elektrostaticky zvlákněných scaffoldů pomocí speciálních kolektorů, provedli *C. Vaquette a J. J. Cooper-White* z *University of Queensland* [54]. Bylo navrženo 6 typů rovinných vzorovaných kolektorů s různými parametry (Obrázek 14).

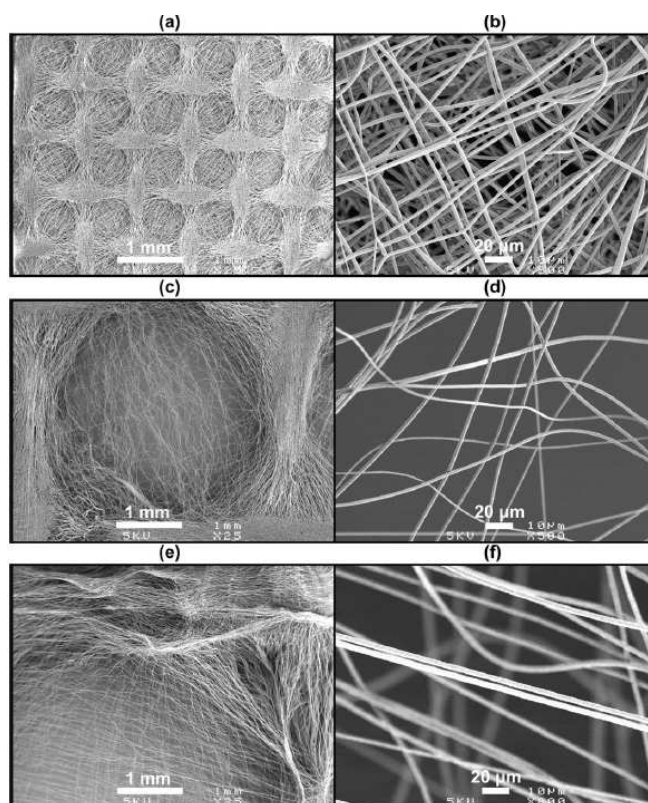


Obrázek 14 – Morfologie speciálních kolektorů. (a-c) Kruhové kolektory s rostoucím průměrem ok: (a) 0,75 mm, (b) 2 mm, (c) 3 mm. (d-f) síťové kolektory: (d) 0,5 mm, (e) 3,3 mm, (f) 5 mm. (g) Kruhový kolektor s 1 mm ostrůvkem uprostřed děr, (h) Hvězdicový kolektor, (i) Žebříkový kolektor. [54]

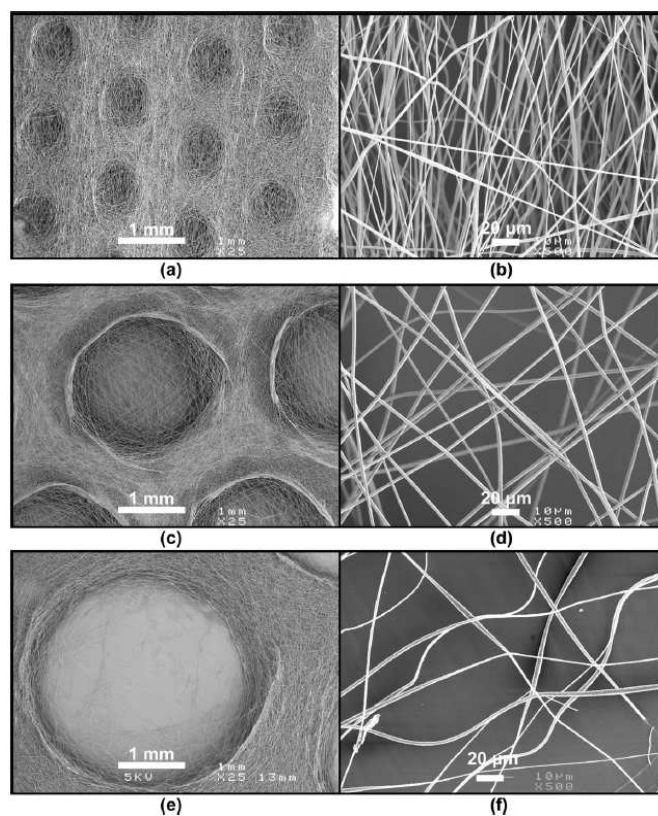
Zvlákněvaným polymerem v této studii byl PCL ($M_m = 80\,000$) rozpuštěný ve směsi chloroform/dimethylformamid (90/10 obj.%). Výsledná koncentrace PCL byla 15 %. Na kolektory byla nanесena nanovláknenná vrstva přibližně 1 mm silná, při silnější vrstvě už začíná být potlačována struktura kolektoru.

Následující snímky zobrazují detail ukládání nanovláken na speciální kolektory. Je zřejmé, že ve volném prostoru mezi kovovými strukturami je menší hustota vláken, vlákna se přednostně usazují na kovové zóny.

Na síťových kolektorech (Obrázek 15) jsou vlákna ve volném prostoru uspořádána náhodně, zatímco podél drátů jsou lehce orientovaná. Tloušťka nanovláknenné vrstvy je rozdílná na kovových částech a v prostoru mezi nimi. Nejradikálnější rozdíl je při největším průměru meziprostoru. Rozdíl těchto zón u kolektoru s 5 mm oky byl přibližně 270 μm . Tento fakt může mít velký vliv na mechanické parametry scaffoldu.



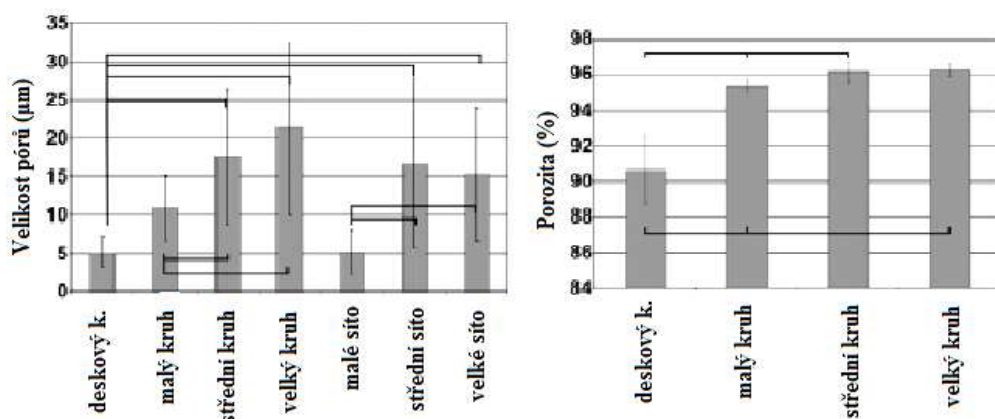
Obrázek 15 – Morfologie scaffoldů zvlákněných na síťové kolektory. (a, b) malé síto 0,5 mm, (c, d) střední síto 3,3 mm, (e, f) velké síto 5 mm. Detaily vláken byly snímány z volného prostoru v síti. [54]



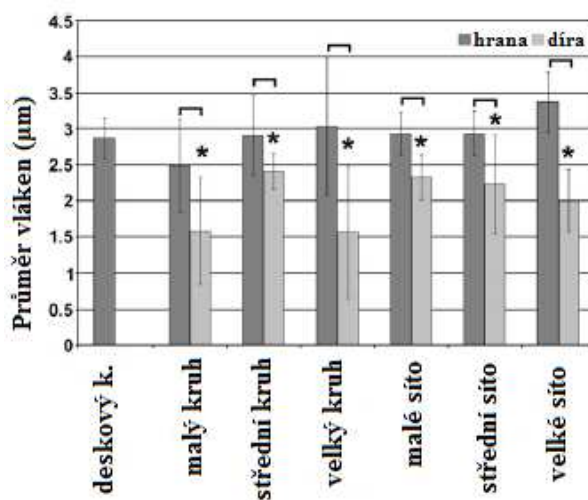
Obrázek 16 – Morfologie scaffoldů zvlákněných na kruhové kolektory. (a, b) malý kruh 0,75 mm, (c, d) střední kruh 2 mm, (e, f) velký kruh 3 mm. Detaily vláken byly snímány z volného prostoru v kruhu. [54]

Na nanovláknenných vrstvách z kruhových kolektorů je patrný stejný způsob ukládání vláken jako na síťových kolektorech (Obrázek 16). Charakteristikou pórů vláknenné vrstvy bylo zjištěno, že s rostoucím průměrem volného prostoru na kolektorech roste velikost pórů, jež může ve volných zónách dosáhnout až makroskopických rozměrů.

Analýza porozity a distribuce pórů ukázala, že je postupně zvyšována velikost pórů se vzrůstající velikostí nevodivého prostoru kolektoru, stejný trend vykazuje i porozita (Obrázek 17). Průměry nanovláken měřené ze SEM snímků byly rozdílné na kovových a volných zónách. Ve volných zónách měla vlákna menší průměr než ta uchycená na kovových částech kolektorů (Obrázek 18).



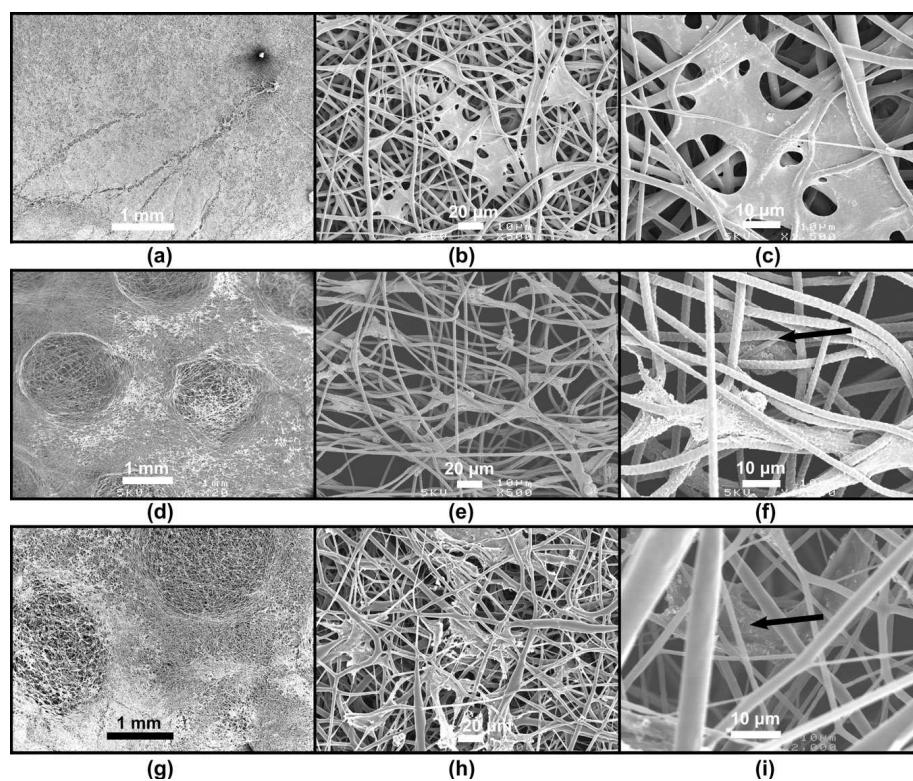
Obrázek 17 – Porozita a velikost pórů scaffoldů zvlákněných na definovaných kolektorech. [54]



Obrázek 18 – Průměry PCL vláken elektrostaticky zvlákněných na charakterizované kolektory. [54]

Na scaffoldech byla následně měřena buněčná aktivita myších fibroblastů NIH 3T3 v průběhu 7 dnů. Buněčná aktivita rostla v průběhu času, nejvyšší buněčná aktivita

po 7 dnech byla změřena pro scaffold z kolektoru se středními kruhy (2 mm). Buňky nasazené na scaffoldech ze středního a velkého kruhového kolektoru prokázaly různé morfologie (Obrázek 19). Na vláknech odpovídajících kovovým zónám se buňky dobře šířily po povrchu scaffoldu, měly relativně hladkou membránu. Buňky uchycené na zónách s menší hustotou vláken se adherovaly podél jednoho nebo dvou vláken a získaly podélný tvar a hrubou membránu, což ukazuje na vysoký stupeň produkce extracelulární matrix. V některých případech bylo pozorováno několik vláken nad plochou těchto buněk, což naznačuje, že se buňkám podařilo infiltrovat scaffoldem (Obrázek 19, znázorněno šipkami). V oblastech s nižší hustotou vláken pronikly buňky do objemu lešení, zatímco na zónách s vyšší hustotou vláken byl na povrchu vytvořen buněčný povlak.



Obrázek 19 – Morfologie a penetrace fibroblastů po 7 dnech kultivace nasazených na scaffoldech zvlákněných na charakterizované kolektory. (a, b, c) – deskový kolektor, (d, e, f) – střední kruhový kolektor, (g, h, i) – velký kruhový kolektor. [54]

Konfokální mikroskopií bylo také dokázáno, že ve vlákenných vrstvách s nižší hustotou vláken a většími póry buňky v definovaném časovém období dosáhly kolonizace větší hloubky objemu scaffoldu. Buňky na scaffoldu z deskového kolektoru

dosáhly za 7 dní hloubky 30 μm , zatímco šířka kolonizované vrstvy scaffoldu ze středního a velkého kruhového kolektoru byla 200 - 250 μm .

Tato studie dokazuje, že větší velikost pórů a nižší hustota vláken elektrostaticky zvlákněných scaffoldů vede k lepší penetraci buněk do objemu těchto scaffoldů.

5.4 Význam elektrostaticky zvlákněných scaffoldů pro tkáňové inženýrství

Shrnutím výsledků výše uvedených studií dostáváme teorii, že pro buněčný růst a penetraci buněk do objemu scaffoldu je vhodná nižší hustota vláken, než vzniká na scaffoldech zvlákněných na konvenčně používané deskové kolektory. Jako nejúčinnější velikost pórů můžeme vymezit hodnoty 10 μm – 25 μm . Dle těchto studií nelze jednoznačně stanovit pozitivní vliv vláken s průměry v nanometrech na buněčnou aktivitu. Průměry vláken zkoumaných scaffoldů se pohybovaly ve stovkách nanometrů i v jednotkách mikrometrů (to především u PCL scaffoldů) a tyto rozměry neměly charakteristický vliv na buněčnou proliferaci.

Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy jsou vhodným materiálem pro kultivaci a proliferaci zvláště menších typů buněk, a to v případě, že bude zvládnutá technologie snižování hustoty vláken a s tím související zvětšování velikosti pórů.

6 Experimentální část

Tato diplomová práce je zaměřena na zvyšování velikosti pórů a snižování hustoty vláken elektrostaticky zvlákněných scaffoldů a vliv těchto parametrů na buněčnou proliferaci a infiltraci do objemu struktury scaffoldu.

Metodou zvolenou pro změnu struktury nanovlákněného scaffoldu bylo použití speciálních strukturovaných kolektorů. Tyto kolektory ovlivnily způsob ukládání nanovláken na povrch kolektorů, jejich rozložení a tím celkovou strukturu nanovlákněného scaffoldu.

7 Materiály a metody

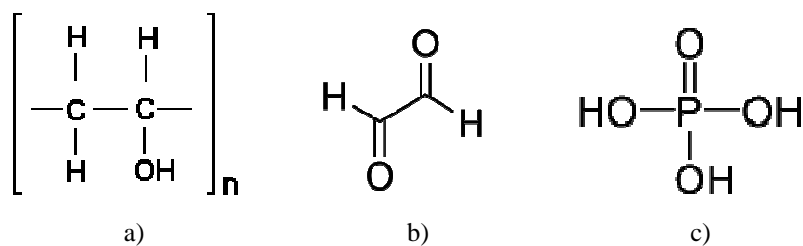
7.1 *Materiál scaffoldů*

Jako materiál pro výrobu scaffoldů byly zvoleny dva biokompatibilní a biodegradabilní polymery – polyvinylalkohol (PVA) a polykaprolakton (PCL). Tyto polymery byly vybrány z důvodu dobré zvláknitelnosti a nízké toxicity použitých rozpouštědel. Scaffoldy z těchto polymerů již prochází biologickým testováním na Technické univerzitě v Liberci na Katedře netkaných textilií.

7.1.1 Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA) je polymer, který se nezískává z monomeru, ten totiž neexistuje. Polyvinylalkohol (Obrázek 20) se připravuje hydrolyzou polyvinylacetátu. PVA je v původní formě bílý krystalický prášek, je rozpustný ve vodě a odolný proti většině organických rozpouštědel. Jeho rozpustnost je závislá na obsahu nezhydrolyzovaného polyvinylacetátu, na střední molekulové hmotnosti a na teplotě. Rozpustnost klesá se vzrůstající molekulovou hmotností. Je málo termoplastický, lze jej používat při teplotách od -50 °C do 130 °C, nad 200 °C se rozkládá a vypařuje. [56]

PVA je odebírán od dodavatele Chemické závody Nováky jako 16hm% vodný roztok. Byl naředěn destilovanou vodou na 12hm% roztok. Protože PVA je rozpustný ve vodě, musí být následně zesíťován. Sítování polymerů je vzájemné spojování polymerních řetězců hlavními nebo vedlejšími vazbami na „nekonečně“ velké makromolekuly. Protože PVA obsahuje hydroxylové skupiny (-OH), lze PVA sítovat aldehydy. Jako sítovací činidlo byl použit 40% vodný roztok glyoxalu ($M_m = 58,04$ g/mol, výrobce Sigma Aldrich). Protože sítovací reakce potřebuje kyselé prostředí, byla do roztoku přidána 85% kyselina fosforečná (výrobce Penta), čímž bylo sníženo pH roztoku a zároveň lehce zvýšena vodivost. Množství přidaného glyoxalu byly 3 hm%, kyseliny fosforečné 4 hm%. Toto množství je zvoleno dle výsledků diplomové práce Nadi Pechové, jež se zabývala sítováním PVA [55]. Nanovláknenné vrstvy PVA byly následně zesíťovány v horkovzdušné komoře při teplotě 136 °C po dobu 5 minut.

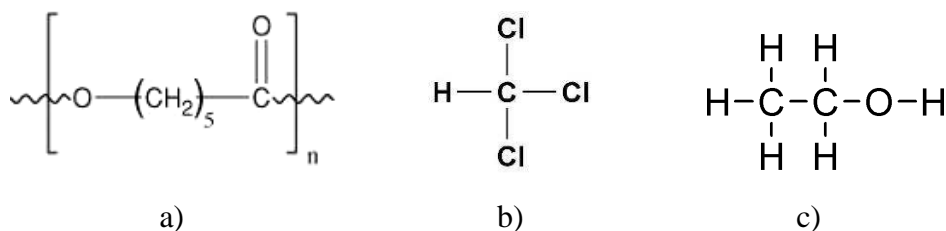


Obrázek 20 – Vzorce chemikálií použitých při přípravě roztoku 12hm% PVA: a) polyvinylalkohol ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)_n, b) glyoxal $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$, c) kyselina fosforečná H_3PO_4

7.1.2 Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL) je termoplastický polymer získávaný chemickou syntézou surové ropy. Přestože není vyráběný z obnovitelných zdrojů, je plně biodegradabilní. Polykaprolakton (Obrázek 21) je rezistentní vůči vodě, oleji, rozpustný v některých organických rozpouštědlech. Má nízkou teplotu tání (58 – 60 °C) a nízkou viskozitu. Je jednoduše zpracovatelný. [57]

PCL ve formě granulátu ($M_m = 45\,000$, výrobce Sigma Aldrich) byl rozpuštěn na 17hm% roztok v rozpouštědlech chloroformu a ethanolu v poměru 8:2. Úplné rozpuštění PCL granulí probíhá za stálého míchání na magnetických míchadlech při 22 °C cca 5 hodin.



Obrázek 21 – Vzorce chemikálií použitých při přípravě roztoku 17% PCL: a) polykaprolakton ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$)_n, b) chloroform CHCl_3 , c) ethanol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

7.2 Elektrostatické zvlákňování polymerních roztoků

Kompletní princip elektrostatického zvlákňování je popsán v Kapitole 2.6. Typem elektrostatického zvlákňování bylo zvoleno hladinové zvlákňování, kdy je polymerním roztokem konstantně smáčen rotující válec. Tento válec může být hladký, strukturovaný nebo strunový. Strunový váleček (Obrázek 22) má po celé délce umístěny 4 ocelové dráty o průměru 0,2 mm. Taylorovy kužely tak v jistém okamžiku, ve kterém je vzdálenost mezi polymerním roztokem na válci a kolektorem nejmenší, vznikají z tenké vrstvy polymerního roztoku po celé ploše povrchu válce či délce struny. Schéma zvlákňovací aparatury vyobrazuje Obrázek 22.

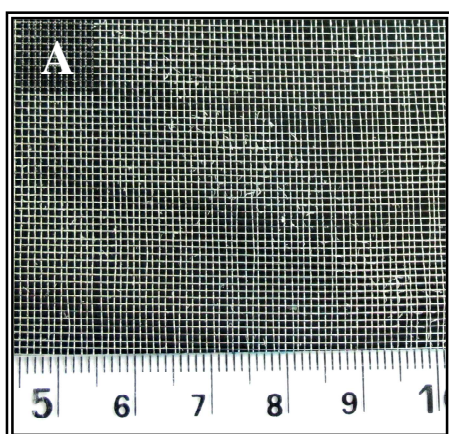


Obrázek 22 – Schéma zvlákňovací soustavy a fotografie strunového válečku.

7.2.1 Speciální strukturované kolektory

Dle odborných studií a výzkumů zmíněných v Kapitole 5.3 byly navrženy 3 typy strukturovaných kolektorů, jež by měly podpořit vznik nanovláknenné struktury s většími póry a vzniklé scaffoldy by měly obsahovat zóny s vyšší a nižší hustotou vláken. Strukturní vlastnosti nanovláknenných vrstev vytvořených na strukturovaných kolektorech byly porovnány s vrstvami nanovláken vytvořených konvenčně na deskové kolektory.

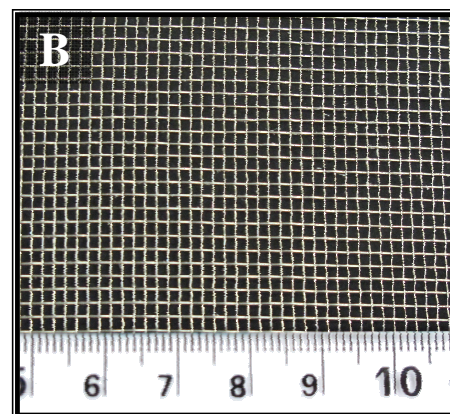
Navržené kolektory mají strukturu mříže s různými parametry. Jediným požadavkem na materiál kolektoru je, aby byl dostatečně elektricky vodivý. Kolektory mají povrchovou nerezovou úpravu.



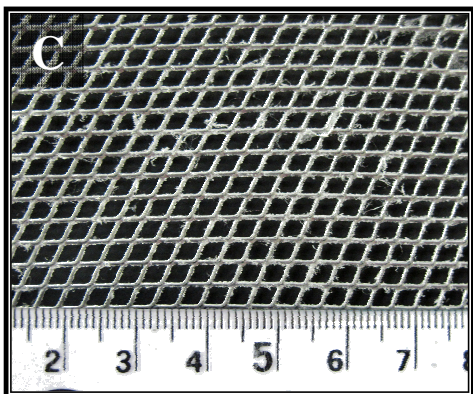
Obrázek 23 – Kolektor A.

Kolektor A (Obrázek 23) je mřížového charakteru, oka mříže mají čtvercový tvar, průměr oka je 1 mm. Výplet je tvořen nerezovým drátem o průměr 0,1 mm. Na jeden centimetr délky výpletu náleží 10 ok. Mříž kolektoru vykazuje určité nepravidelnosti, jež jsou dány jemnou strukturou použitého materiálu, nicméně tyto nepravidelnosti významně neovlivňují výsledný charakter nanovláknenné vrstvy.

Kolektor B (Obrázek 24) je mřížového charakteru, oka mříže mají obdélníkový tvar, průměr oka je 2 mm. Výplet je zhotoven z nerezového drátu průměru 0,2 mm. Na jeden centimetr délky výpletu náleží 6,5 ok. Mříž kolektoru je pevná, stabilní, nepodléhá strukturním změnám pod mechanickým tlakem způsobovaným užíváním.



Obrázek 24 – Kolektor B.



Obrázek 25 – Kolektor C.

Kolektor C (Obrázek 25) je mřížového charakteru, oka mříže mají kosočtvercový tvar, průměr oka je 3 mm (akceptujeme průměr kružnice vepsané). Mříž je tvořena nerezovým drátem o průměru 1 mm. Na jeden centimetr délky mříže náleží 3 oka. Mříž kolektoru je mechanicky stabilní.

Deskový kolektor je rovinná kontinuální plocha z nerezového elektricky vodivého materiálu. Deskový kolektor je konvenčně používán při procesu elektrostatického zvlákňování, využíván je například i v technologii Nanospider.

Problematická se ukázala adheze nanovlákněné vrstvy na kolektor, jež komplikovala sejmutí vytvořených vrstev z povrchu kolektoru v kompaktní podobě. Technologické řešení, jež tento problém eliminovalo, bylo vytvoření čtvercových papírových rámců na povrch kolektoru. Rámy byly připevněny lepicí páskou tak, aby těsně přilnuly k povrchu kolektoru. Nanovlákněná vrstva pak vznikala na povrchu kolektoru s papírovým rámem. Vrstvu pak bylo možné sejmut s papírovým rámem v definovaném tvaru, přičemž porušení struktury bylo minimalizováno. Nanovlákněné vrstvy PVA nanovláken byly zesítovány v horkovzdušné komoře na kolektorech a sejmuty až po zesítování.

7.2.2 Průběh elektrostatického zvlákňování polyvinylalkoholu

Roztoky PVA byly zvlákňovány ze strukturovaného a strunového válečku. Válec byl napojen na zdroj kladného napětí od firmy SPELLMAN SL150. Na kolektor bylo přivedeno záporné napětí ze stejného typu zdroje. Kolektor byl umístěn ve vzdálenosti 15 cm od rotujícího válce.

Byly vyrobeny 3 nanovlákněné vrstvy na každý kolektor, přičemž byly dodržovány relativně konstantní podmínky prostředí. Teplota se v průběhu zvlákňování pohybovala v rozmezí 17,0 °C – 20,5 °C, vlhkost 39 % – 42 %. Čas, po který probíhalo

zvlákňování jednotlivých nanovláknenných vrstev, byl 9 min. Roztoky PVA se zvlákňovaly velmi neochotně a neefektivně, z toho důvodu bylo přidáno do roztoku malé množství povrchově aktivní látky. To se ukázalo jako nevhodné, neboť zamezilo následnému zesíťování nanovláknenné vrstvy. Po této zkušenosti byl již zvlákňován pouze roztok bez povrchově aktivní látky.

Kritické napětí nutné pro průběh zvlákňování bylo pro všechny kolektory v podstatě totožné, lišilo se pro roztok obsahující povrchově aktivní látku. Pro zvlákňování roztoku s povrchově aktivní látkou bylo nutné kritické napětí v rozsahu 46,9 kV – 49,0 kV. Bez povrchově aktivní látky kritické napětí vzrostlo až na 63,1 kV.

7.2.3 Průběh elektrostatického zvlákňování polykaprolaktonu

Roztok PCL byl zvlákňován na stejné aparatuře, jako je popsána v Kapitole 7.2.2. Jako kladná elektroda byl použit pouze strunový válec, kolektor byl umístěn ve vzdálenosti 17 cm od rotujícího válce. Roztoky PCL se zvlákňovaly velmi ochotně a konstantně. Rovnoměrně po celé délce struny vznikalo velké množství Taylorových kuželů (viz Kapitola 2.6). Výjimečně se mezi dvěma sousedními strunami vytvořila tenká polymerní blanka, která v určitém okamžiku praskla a vyústila ve velké množství vláken, jež byla přitahována ke kolektoru.

Podmínky prostředí při výrobě jednotlivých vrstev byly udržovány na relativně konstantních hodnotách. Teplota prostředí se pohybovala v rozpětí 18,3 °C – 20,3 °C, vlhkost 28 % - 30 %. Zvlákňování jednotlivých vrstev probíhalo vždy 7 minut.

Kritické napětí potřebné pro plynulé zvlákňování PCL se pro rozdílné kolektory lišilo. Pro kolektor A byly hodnoty 60 kV, 53 kV a 50,4 kV; pro kolektor B 64 kV, 54,6 kV a 53,2 kV. Dostačující hodnoty pro vytvoření vláknenné vrstvy na kolektoru C byly 52 kV, 43 kV a 40,6 kV.

7.3 Charakterizace materiálů

7.3.1 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Mikroskopické snímky samostatných vlákenných vrstev byly pořízeny na rastrovacím elektronovém mikroskopu PHENOM, FEI Company a na rastrovacím elektronovém mikroskopu ZEISS ULTRA Plus, Carl ZEISS. Před samotným mikroskopováním musely být vzorky pozlaceny, aby se zvýšila vodivost povrchu vzorku, což je podmínkou elektronové mikroskopie, jež využívá interakce elektronů s pevnou látkou. Pro pozlacení vzorků byla použita naprašovačka Q150R ES, Quorum Technologies. Vzorky byly napařeny 2nm vrstvou zlata v argonové atmosféře. Hustota zlata byla 19,32 g/m³.

7.3.2 Parametry nanovláknenných vrstev

Parametry vzorků byly proměřovány v prostředí programu NIS Elements, kde se ze snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu naměřily a statisticky zpracovaly hodnoty průměrů vláken a velikosti pórů jednotlivých druhů scaffoldů.

7.3.3 Statistické zpracování výsledků

Pro vyhodnocení významnosti rozdílu velikosti pórů a průměrů vláken na vodorovné přímce a v prostoru mezi příčkami scaffoldu z jednotlivých kolektorů byl použit dvouvýběrový f-test shody rozptylů a dvouvýběrový t-test.

Výsledné hodnoty MTT testu byly průměrem rozdílu absorbance při 650 nm a 570 nm ze čtyř vzorků pro jednotlivý test.

7.4 In vitro testy

7.4.1 Biologický materiál

Biologické testování probíhalo v Laboratoři tkáňového inženýrství na Technické univerzitě v Liberci, katedře netkaných textilií. Jako biologický materiál byly použity myší fibroblasty 3T3. Před nasazením buněk byly scaffoldy sterilizovány 30 min v 70% ethanolu. Na každý vzorek o průměru 6 mm bylo nasazeno $2 \cdot 10^4$ buněk. Buňky byly před nasazením kultivovány v kultivačním médiu (90 % DMEM, 10 % FBS, 1 % antibiotikum – vše výrobce Lonza). Po dosažení 80% konfluence byly ztrypsinizovány a naředěny na požadovanou hustotu. Médium buňkám bylo vyměňováno dle aktuální potřeby během kultivace na scaffoldech.

7.4.2 Test viability buněk

Proliferace a viabilita buněk v časovém rozmezí 7 dnů od nasazení 3T3 myších fibroblastů byla měřena MTT testem. Tato metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT, výrobce Sigma Aldrich) na formazan, který vytvoří reakcí na mitochondriální membráně živých buněk fialové krystalky. Ty jsou pak rozpuštěny okyseleným isopropanolem (IPA + HCl, výrobce Penta). Zabarvení se následně vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm s referenční vlnovou délkou 650 nm (spektrofotometr ELx808, BioTek). Množství živých buněk pak odpovídá hodnotě absorbance.

Scaffoldy s buňkami byly umístěny do směsi 50 μ l MTT roztoku (0,1 g MTT rozpuštěné v 50 ml PBS, přefiltrované) a 150 μ l DMEM (výrobce Lonza). Reakce probíhala v inkubátoru při 37 °C po dobu 4 hodin. Krystalky formazanu byly následně úplně rozpuštěny v okyseleném isopropanolu, zabarvený roztok isopropanolu byl přemístěn do nové kultivační destičky a vyhodnocen spektrofotometricky dle postupu popsaného výše. Vyhodnocování probíhalo pro každý typ scaffoldu ze čtyř vzorků, hodnoty absorbance byly zprůměrovány a statisticky vyhodnoceny.

7.4.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční snímky scaffoldů s barevně zvýrazněnými DNA buněk byly pořízeny na mikroskopu NIB-100, Novel Optics (zvětšeno 10x) a na mikroskopu Zeiss AxioImager M2, Carl ZEISS (zvětšeno 5x). Scaffoldy se nejprve promyly v PBS, pak byly buňky na scaffold fixovány v mraženém methanolu při 4°C po dobu 15 minut. Po skončení fixace byly vzorky barveny roztokem propidium jodidu (50 μ l PI + 10 ml PBS), který se váže na buněčnou DNA. Buňky se pak ve fluorescenčním mikroskopu jeví červeně. Barvení propidium jodidem probíhá 15 minut, vzorky jsou umístěny ve tmě.

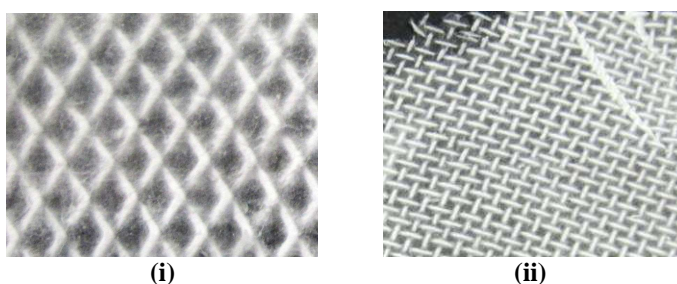
7.4.4 Rastrovací elektronová mikroskopie vzorků s buněčným materiálem

SEM snímky scaffoldů po ukončení kultivace buněk byly zhotoveny na rastrovacím elektronovém mikroskopu PHENOM, FEI Company. Scaffoldy s kultivovanými buňkami se nejprve promyjí v PBS pufru, následně jsou buňky na scaffold fixovány po dobu 15 minut při 4°C v roztoku 2,5% glutaraldehydu/PBS. Po skončení fixace jsou vzorky odvodněny promýváním vzestupnou ethanolovou řadou 60% - 70% - 80% - 90% - 96% - 100%, vždy 10 minut, a následně vysušeny v inkubátoru nejméně 10 hodin. Před pozorováním SEM musí být opět pozlaceny (viz Kapitola 7.3.1).

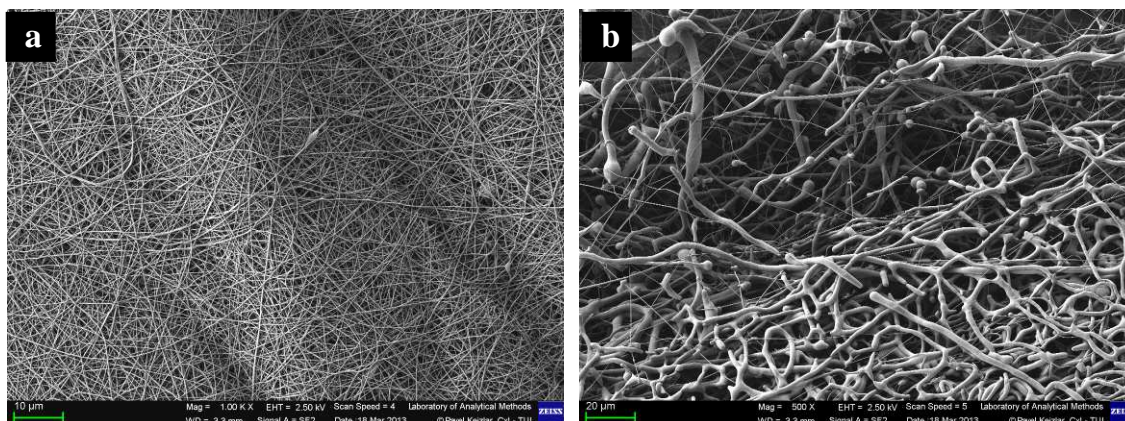
8 Výsledky

8.1 Struktura nanovláknenných vrstev

Při zvláknění polymerních roztoků na strukturované kolektory se dle předpokladů vytvořily ve vrstvě segmenty s vyšší a nižší hustotou vláken, toto rozložení je makroskopicky pozorovatelné. Je to způsobené tím, že vznikající polymerní vlákna jsou primárně přitahována na nabitě kovové části kolektoru, kde je intenzita elektrického pole vyšší, než v prostoru mezi příčkami. Zřetelné je rozložení vláken dle struktury kolektoru (Obrázek 26). Na kovových částech se vlákna usazovala s větší hustotou, v prostorech mezi kovovými příčkami byla hustota vláken menší. Změny charakteru nanovláknenných vrstev byly patrné i při mikroskopickém pozorování, jak dokládá Obrázek 27. Na SEM snímcích je změna hustoty vláken a morfologie povrchu.



Obrázek 26 – Makroskopická struktura nanovláknenné vrstvy 17hm% PCL zvlákněného na kolektor C (i) a A (ii)



Obrázek 27 – Morfologie povrchu a přechod hustoty vláken v nanovláknenné vrstvě 12hm% PVA (a, měřítko 10 μm) a 17hm% PCL (b, měřítko 20 μm) z kolektoru B.

8.2 Charakteristika nanovláknenných vrstev 12hm% PVA

Výsledné hodnoty charakterizace nanovláknenných vrstev 12hm% PVA zvlákněného na kolektory A, B, C a deskový kolektor reprezentuje Tabulka 6.

Tabulka 6 – Střední hodnoty průměru vláken a plochy pórů nanovláknenných vrstev 12hm% PVA .

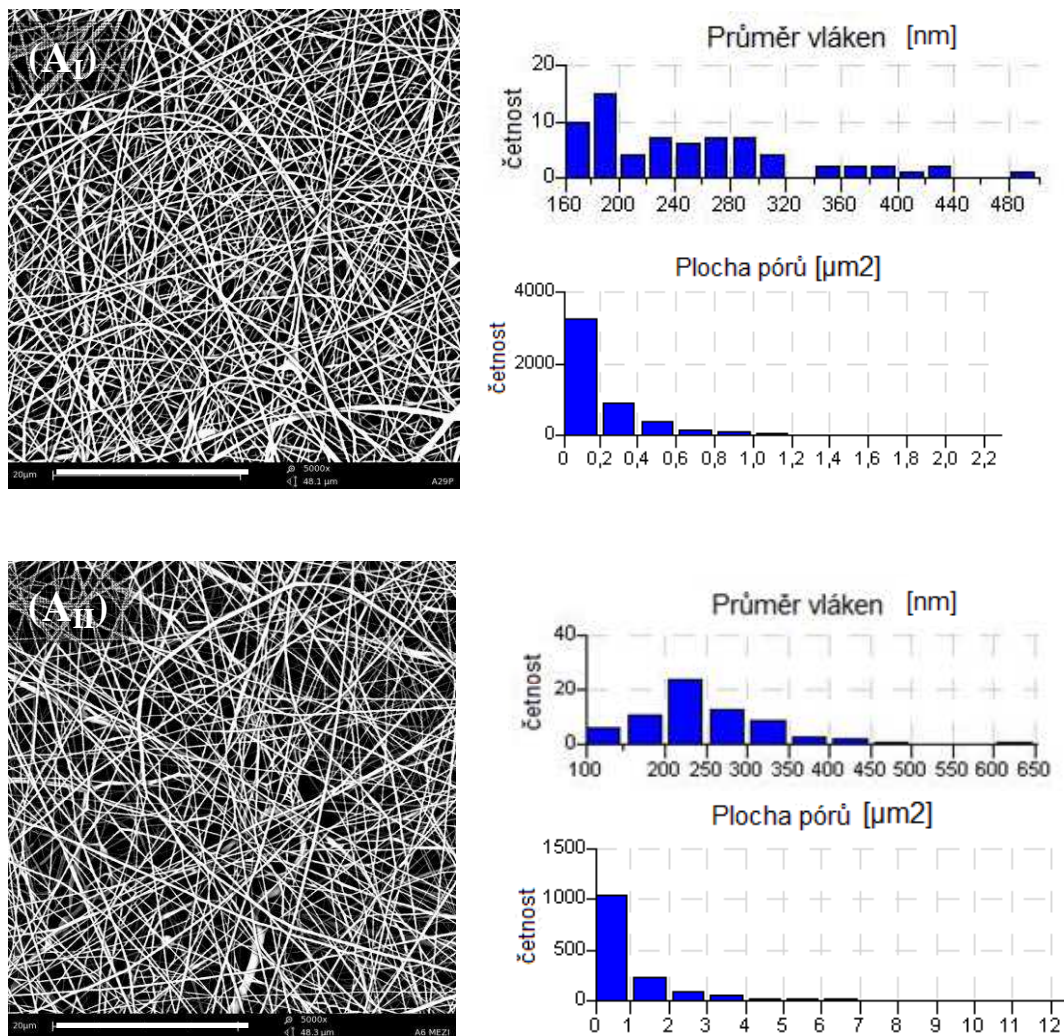
PVA 12hm%		Průměr vláken [nm] - střední hodnota	Plocha pórů [μm^2] - střední hodnota
Kolektor A	příčka	252,06 \pm 37,30	0,19 \pm 0,11
	meziprostor	249,16 \pm 43,31	1,04 \pm 0,81
Kolektor B	příčka	240,77 \pm 39,86	0,32 \pm 0,20
	meziprostor	224,63 \pm 47,94	1,88 \pm 1,64
Kolektor C	příčka	219,20 \pm 37,93	0,27 \pm 0,16
	meziprostor	237,61 \pm 48,38	2,97 \pm 2,81
Deskový kolektor		286, 26 \pm 43,42	0,58 \pm 0,38

Z Tabulky 6 je patrné, že **průměr vláken** je v místech mezi vodivými příčkami kolektoru menší než na kovových příčkách u kolektoru A a B, u kolektoru C to neplatí. Tyto rozdíly jsou u všech kolektorů statisticky významné. Celkově jsou vlákna menších průměrů ve vrstvách zvlákněných na strukturované kolektory než na deskový kolektor. Vlákna 12hm% PVA dosahují na strukturovaných kolektorech průměru 219,20 nm – 252,06 nm, vlákna zvlákněná na deskový kolektor mají střední hodnotu průměru 289,26 nm.

Průměrné hodnoty velikosti **plochy pórů** mezi vlákny dokazují, že na nekovových zónách kolektoru se tvoří nanovláknenná vrstva s většími póry, než na kovových příčkách. Tyto rozdíly jsou statisticky významné. U kolektorů A a B jsou póry v meziprostoru přibližně 5,5x větší než na příčce, u kolektoru C až 11x větší. V porovnání s vrstvou z deskového kolektoru jsou póry na příčkách menší než na deskovém kolektoru, póry v meziprostoru jsou větší. Je zde patrná závislost velikosti mezivláknenných pórů na velikosti mřížky kolektoru. Se zvětšováním velikosti ok mřížky se zvětšuje velikost mezivláknenných pórů. Největší póry jsou v meziprostoru vrstvy z kolektoru C, průměrná hodnota je $2,97 \mu\text{m}^2 \pm 2,81 \mu\text{m}^2$, což je přibližně 5x větší hodnota než u nanovláknenné vrstvy zvlákněné na deskový kolektor.

Na Obrázcích 28, 29, 30, 31 jsou zaznamenána rozložení velikosti průměrů vláken a ploch pórů jednotlivých vrstev PVA nanovláken na strukturovaných

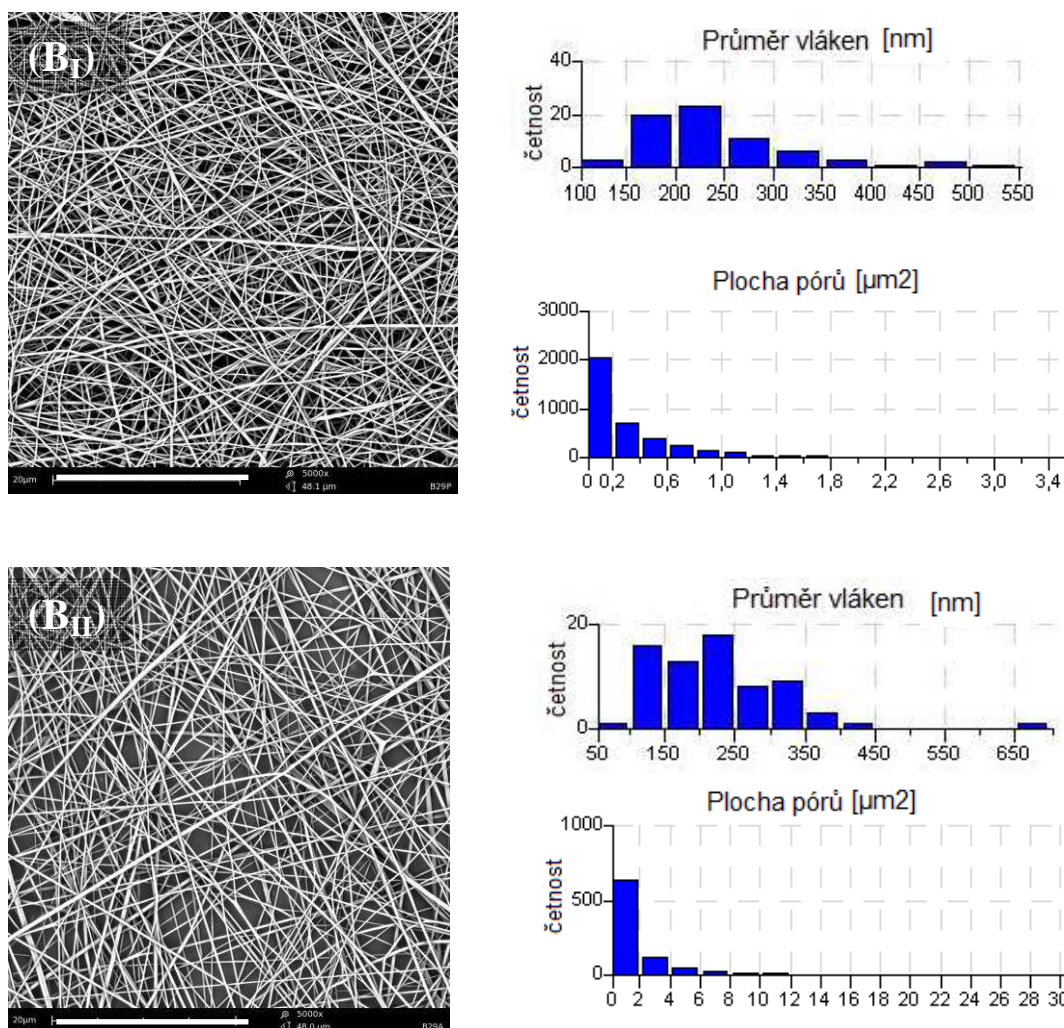
kolektorech a deskovém kolektoru. Na SEM snímcích jsou rozlišena nanovláknna na kovových příčkách a v nekovových zónách jednotlivých kolektorů.



Obrázek 28 – SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na kolektor A. (A_I) příčka kolektoru, (A_{II}) meziprostor. Měřítko 20 μm.

Při porovnání SEM snímků je viditelný rozdíl hustoty vláken a velikosti pórů v rozdílných místech nanovláknenné vrstvy.

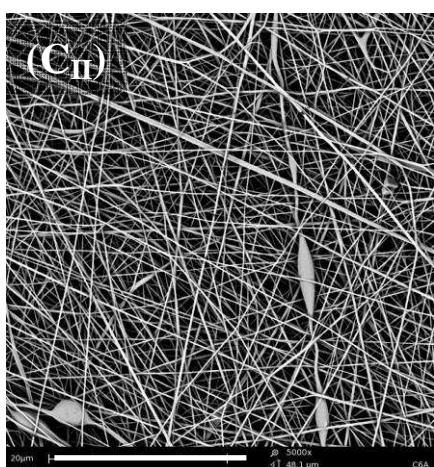
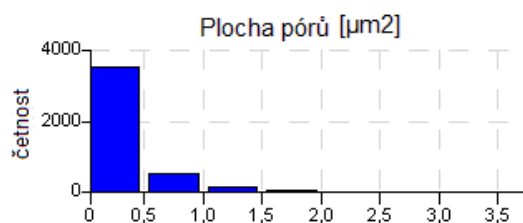
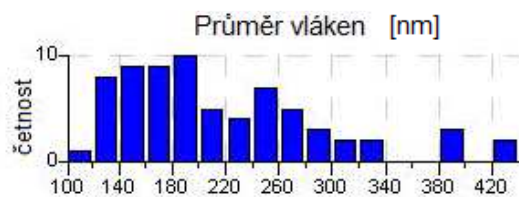
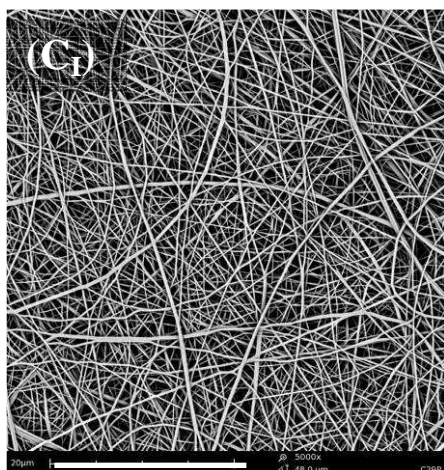
Porovnáme-li rozložení velikosti průměru nanovláken ze všech kolektorů, shledáme, že na kovové příčce i v meziprostoru se vyskytovala vlákna o průměru 100 nm až 550 nm, výjimečně 650 nm. U jednotlivých kolektorů se ale liší četností výskytu daných hodnot průměrů.



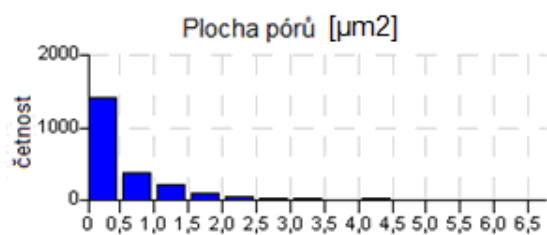
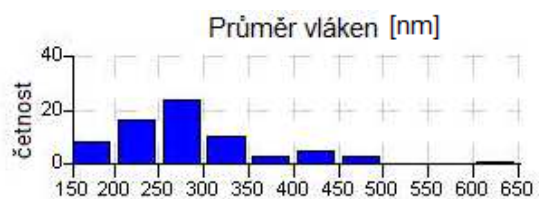
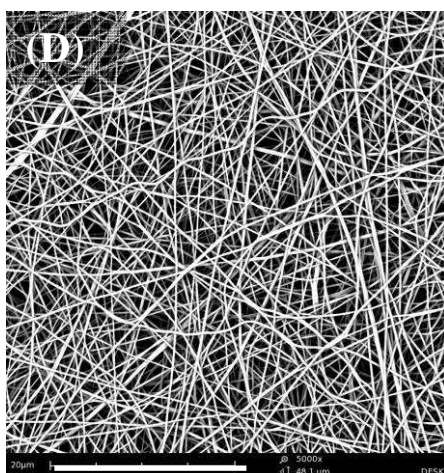
Obrázek 29 - SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na kolektor B. (B_I) příčka kolektoru, (B_{II}) meziprostor. Měřítka 20 μm.

Významné jsou rozdíly ve velikostech plochy pórů, srovnáme-li hodnoty z kovové příčky a meziprostoru nanovlákněných vrstev z jednotlivých kolektorů. Tyto hodnoty náležící vrstvě z meziprostoru jsou o řád vyšší než hodnoty nanovlákněné vrstvy z kovové příčky. Velikost plochy pórů deskového kolektoru (Obrázek 31) odpovídá velikosti pórů nanovlákněné vrstvy na příčce kolektoru.

Z prezentovaných výsledků charakterizace nanovlákněných vrstev 12hm% PVA konstatujeme, že v meziprostoru kovové mříže kolektoru se tvoří vrstva s vlákny menších průměrů a většími póry než na deskovém kolektoru.



Obrázek 30 - SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na kolektor C. (C_I) příčka kolektoru, (C_{II}) meziprostor. Měřítka 20 μm.



Obrázek 31 – SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na deskový kolektor (D). Měřítka 20 μm.

8.3 Charakteristika nanovláknenných vrstev 17hm% PCL

Výsledné hodnoty charakterizace nanovláknenných vrstev 17hm% PCL zvlákněného na kolektory A, B, C a deskový kolektor reprezentuje Tabulka 7.

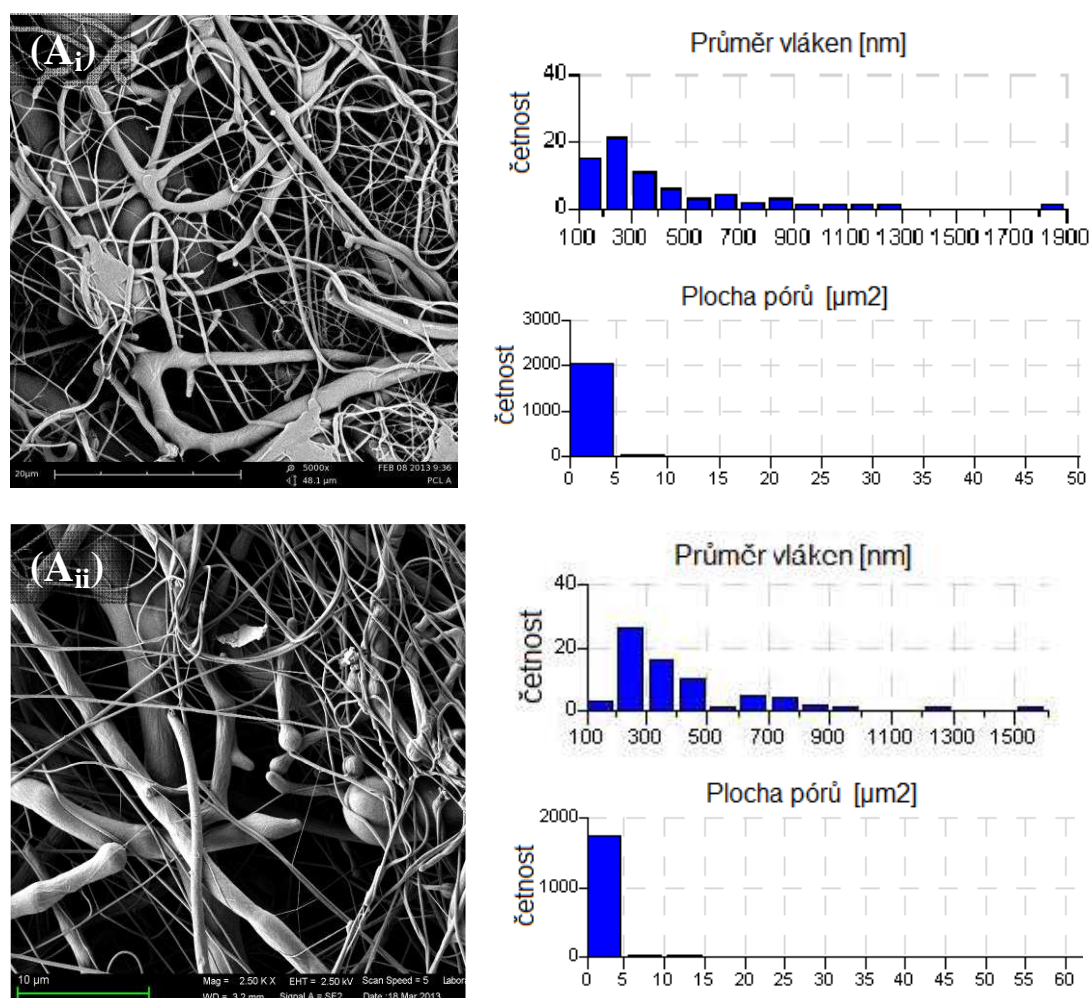
Tabulka 7 - Střední hodnoty průměru vláken a plochy pórů nanovláknenných vrstev 17hm% PCL.

PCL 17hm%		Průměr vláken [nm] - střední hodnota	Plocha pórů [μm^2] - střední hodnota
Kolektor A	příčka	415,57 \pm 151,77	0,54 \pm 1,16
	meziprostor	415,71 \pm 126,25	0,95 \pm 1,57
Kolektor B	příčka	1281,00 \pm 435,60	0,41 \pm 0,74
	meziprostor	1029,45 \pm 296,46	5,60 \pm 8,30
Kolektor C	příčka	1539,92 \pm 295,86	0,94 \pm 5,49
	meziprostor	958,21 \pm 355,02	1,32 \pm 42,37
Deskový kolektor		2382,82 \pm 665,93	2,93 \pm 3,75

Střední hodnoty **průměrů vláken** 17hm% PCL zvlákněných na dané kolektory jsou v řádech stovek nanometrů, přičemž překračují hodnoty 1000 nm, tedy hranici, jež vymezuje nanovláknena dle obecné definice. Není prokázáno, že průměr vláken v jednotkách mikrometrů má negativní vliv na buněčnou adhezi a proliferaci (Kapitola 5.4). Na vrstvě nanovláken z kolektoru A jsou střední hodnoty průměrů nanovláken z kovové příčky a meziprostoru srovnatelné, jsou rovny 415,57 nm \pm 151,77 nm a 415,71 nm \pm 126,25 nm. Střední hodnoty průměrů vláken z kolektoru B, C a deskového kolektoru byly naměřeny významně vyšší. Na kolektoru B je střední hodnota průměru vláken z kovové příčky 1281,00 nm \pm 435,60 nm, z meziprostoru 1029,45 nm \pm 296,46 nm. Vláknena zvlákněná na kolektor C dosáhla na příčce střední hodnoty průměru 1539,92 nm \pm 295,86 nm, v meziprostoru byla vláknena významně tenčí se střední hodnotou průměru 958,21 nm \pm 355,02 nm. Vláknena na deskovém kolektoru měla v porovnání s ostatními největší průměr, střední hodnota se rovnala 2382,82 nm \pm 665,93 nm. Z těchto výsledků můžeme konstatovat, že na strukturovaných kolektorech se tvoří vláknena menšího průměru, než na deskovém kolektoru. Na kovových příčkách strukturovaných kolektorů se tvoří vláknena větších průměrů než v meziprostoru. Tyto rozdíly jsou statisticky významné.

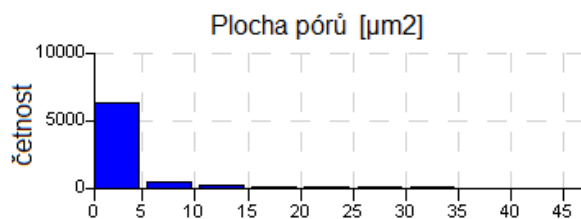
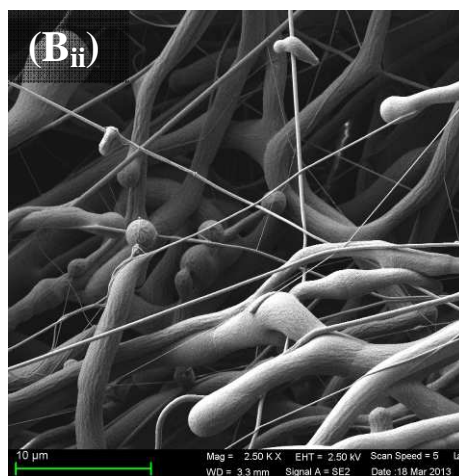
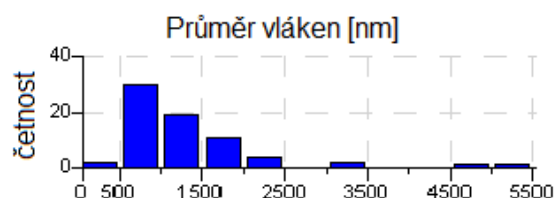
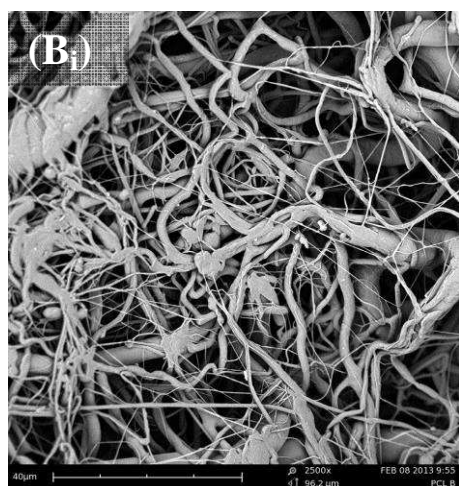
Plochy pórů PCL scaffoldů dosahovaly specifických rozměrů pro každý typ kolektoru, v meziprostoru byly póry u jednotlivých kolektorů vždy větší než na příčkách kolektoru. Střední hodnoty plochy pórů nanovlákněné vrstvy z kolektoru A byly nejmenší - $0,54 \mu\text{m}^2 \pm 1,16 \mu\text{m}^2$ pro vrstvu z kovové příčky kolektoru, v meziprostoru $0,95 \mu\text{m}^2 \pm 1,57 \mu\text{m}^2$. Největší póry byly dle střední hodnoty vyhodnoceny v meziprostoru kolektoru B, dosáhly plochy $5,60 \mu\text{m}^2 \pm 8,30 \mu\text{m}^2$. Můžeme konstatovat, že v prostoru mezi kovovými příčkami kolektoru se tvoří nanovlákněná vrstva s většími póry než na kovových částech, a to z důvodu přednostního ukládání vláken na vodivé části. Rozdíly ve velikosti pórů jsou statisticky významné.

Na Obrázcích 32, 33, 34, 35 jsou zaznamenána rozložení velikosti průměrů vláken a ploch pórů jednotlivých vrstev nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na strukturované kolektory a deskový kolektor.



Obrázek 32 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na kolektor A. (A_i) příčka kolektoru, měřítko 20 μm , (A_{ii}) meziprostor, měřítko 10 μm .

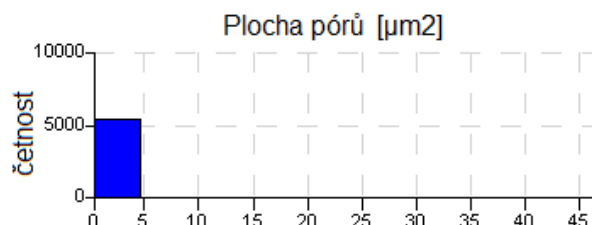
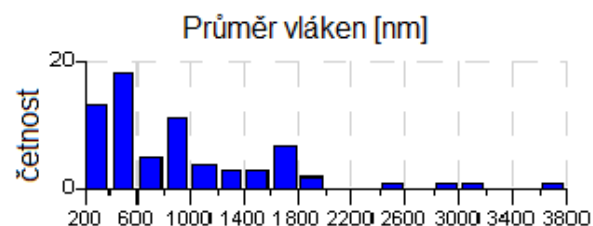
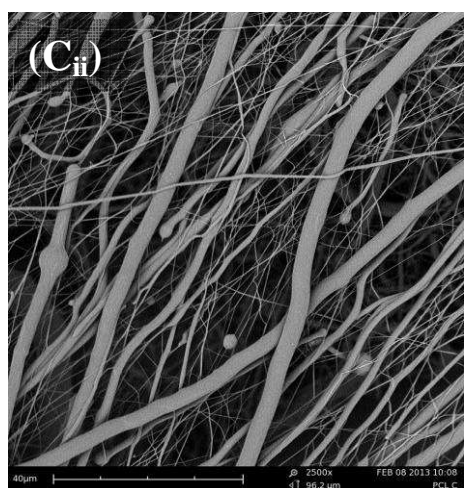
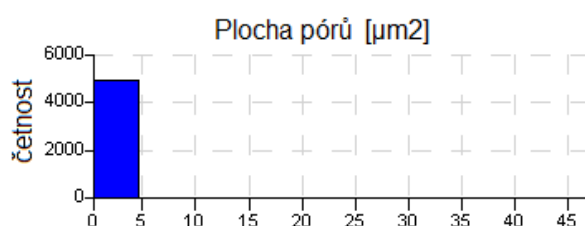
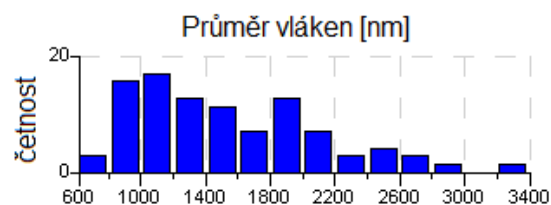
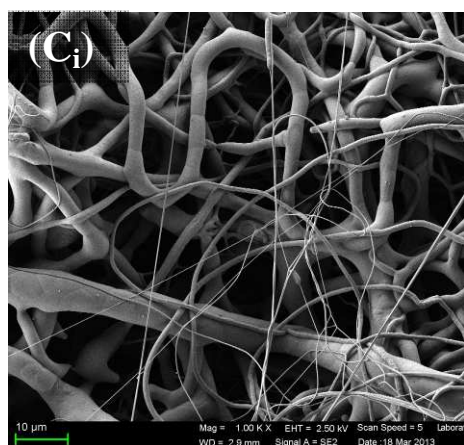
Na SEM snímcích PCL nanovláken vidíme, že ve vrstvách se vyskytují jak velmi tenká vlákna průměrů dosahujících 100 nm, tak vlákna o průměru až 2200 nm. Nalezneme i svazky slepených vláken o průměru až 5500 nm (Obrázek 33). Tato charakteristika nanovláčkové vrstvy PCL je patrná i na vrstvě z deskového kolektoru (Obrázek 35).



Obrázek 33 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na kolektor B. (B_i) příčka kolektoru, měřítko 40 µm, (B_{ii}) meziprostor, měřítko 10 µm.

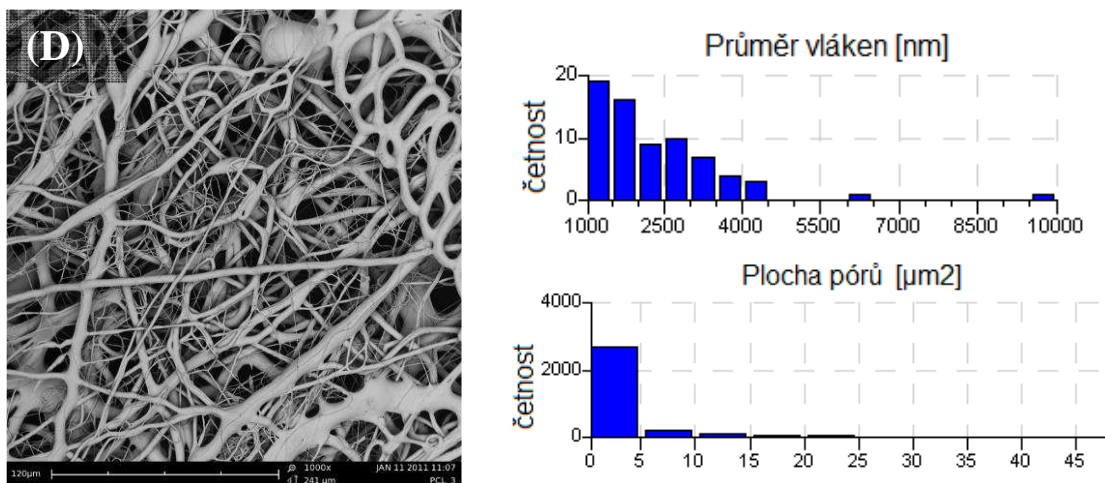
Plochy pórů se dle histogramů charakterizujících jednotlivé nanovláčkové vrstvy významně neliší, velikost pórů je vždy nejčastější v rozsahu 0 – 5 µm. Tento údaj je ale zavádějící, neboť v Tabulce 7 jsou zaznamenány také hodnoty směrodatné odchylky, jež jsou vždy větší, než samotná střední hodnota plochy pórů, u kolektorů B a C mnohonásobně. Zajímavá jsou maxima a minima plochy pórů u jednotlivých vrstev, jež

mají velmi široký rozptyl, hlavně v meziprostorech nanovláknenných scaffoldů. Na kolektoru A se póry v meziprostoru pohybují v rozsahu $0,01 \mu\text{m}^2 - 84,36 \mu\text{m}^2$, na kolektoru B v meziprostoru $0,21 \mu\text{m}^2 - 204,40 \mu\text{m}^2$ a na kolektoru C se v meziprostoru vyskytují póry o velikosti $0,01 \mu\text{m}^2 - 6243,90 \mu\text{m}^2$.



Obrázek 34 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na kolektor C. (C_i) příčka kolektoru, měřítko 10 μm , (C_{ii}) meziprostor, měřítko 40 μm .

Na snímcích (Obrázky 32, 33, 34) je patrný specifický tvar vláken. Vlákná jsou často přetrhaná a zakončená polymerní kuličkou o velikosti mírně přesahující průměr vláken. Tento jev se frekventovaně vyskytuje na nanovlákněch z meziprostoru kolektorové mříže a může být způsoben vzdáleností kovových příček mříže.



Obrázek 35 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na deskový kolektor (D).
Měřítka 120 μm.

Nanovláknenná struktura PCL scaffoldů je chaoticky uspořádaná, velmi nesourodá, průměry vláken se pohybují v rozpětí stovek nm až jednotek μm, což vhodně imituje přirozené prostředí ECM. ECM je tvořena převážně svazky kolagenových vláken s průměrem 0,5 μm - 15 μm a fibrinovými vlákny o průměru 0,1 μm - 10 μm (Kapitola 4.4). Tyto scaffoldy tak mají velký potenciál pro adhezi a proliferaci buněčného materiálu.

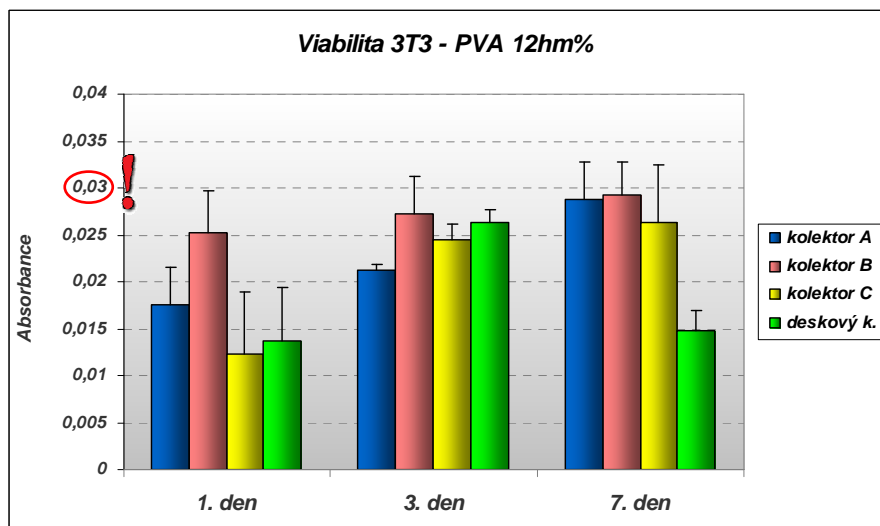
8.4 Buněčné testování scaffoldů

Test cytotoxicity scaffoldů a růstu buněk na scaffoldech byl prováděn a vyhodnocen v Laboratoři tkáňového inženýrství Fakulty textilní dle postupu uvedeného v Kapitole 7.4.1, 7.4.2.

8.4.1 Buněčné testování 12hm% PVA

Polyvinylalkohové scaffoldy byly nejprve otestovány zkušebně na růst buněk 3T3 po 3. dnu od nasazení buněk. Výsledná viabilita byla velmi nízká, nicméně detekovatelná. Materiál byl tedy shledán cytotoxický a bylo přistoupeno k testování buněčné viability po dobu 7 dnů.

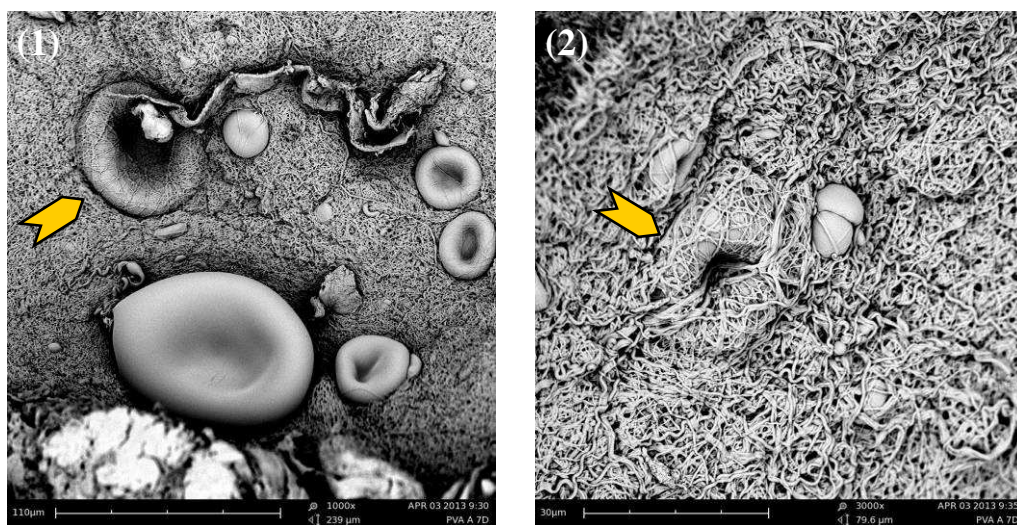
Viabilita buněk 3T3 na PVA scaffoldech dle MTT testu vyšla velmi nízká (Obrázek 36), po vyhodnocení pod hranicí detekovatelnosti absorbance, jež je dle grafu lineární závislosti počtu buněk na optické denzitě (Příloha A) stanovena na 0,03. Při procesu testování nebyla pozorována tvorba fialových krystalků reakcí s MTT, což značilo nepřítomnost živých buněk na scaffoldu.



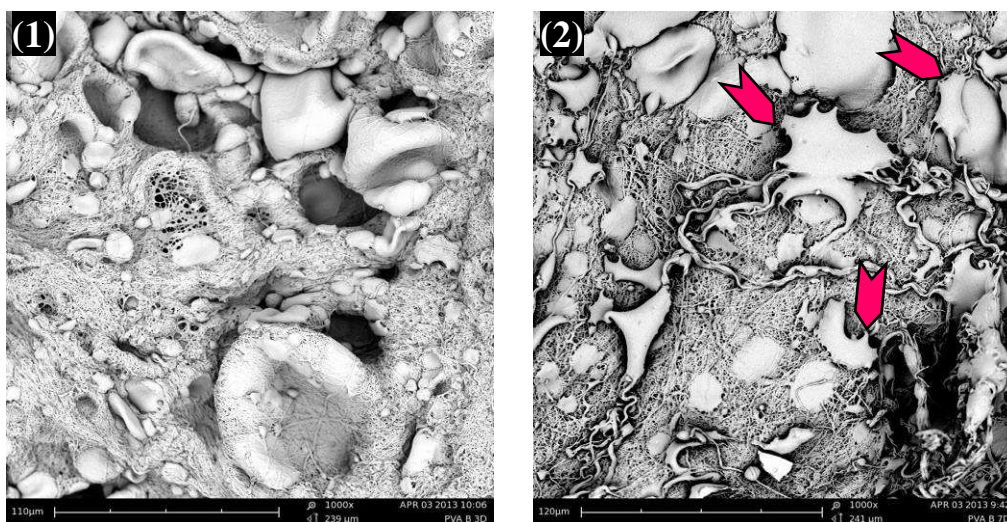
Obrázek 36 – Viabilita 3T3 buněk na scaffoldech 12hm% PVA.

Absorbance nepřesáhla mez detekovatelnosti, takže tyto výsledky považujeme za negativní. Buňky na scaffoldech z 12hm% PVA nebyly po 7 dnech kultivace viabilní.

Tento závěr byl potvrzen při mikroskopickém pozorování scaffoldů s kultivovanými buňkami. Na snímcích lze detekovat buňky v nanovláknenné struktuře, ale tvar buněk neodpovídá viabilním fibroblastům, jež mají protáhlý hvězdicovitý tvar. Buňky na scaffoldech jsou kulovitěho tvaru o průměru 20 μm – 40 μm , extrémně 100 μm . V některých segmentech scaffoldů lze identifikovat buňky s planární strukturou, hvězdicovitěho tvaru nicméně nedosáhly, na Obrázcích 38, 40 označeny šipkami. Buňky tvarově odpovídají neviabilním až apoptickým buňkám.



Obrázek 37 – Scaffold 12hm% PVA z kolektoru A s buňkami 3T3, 7. den kultivace. Měřítka 110 μm (1), 30 μm (2).

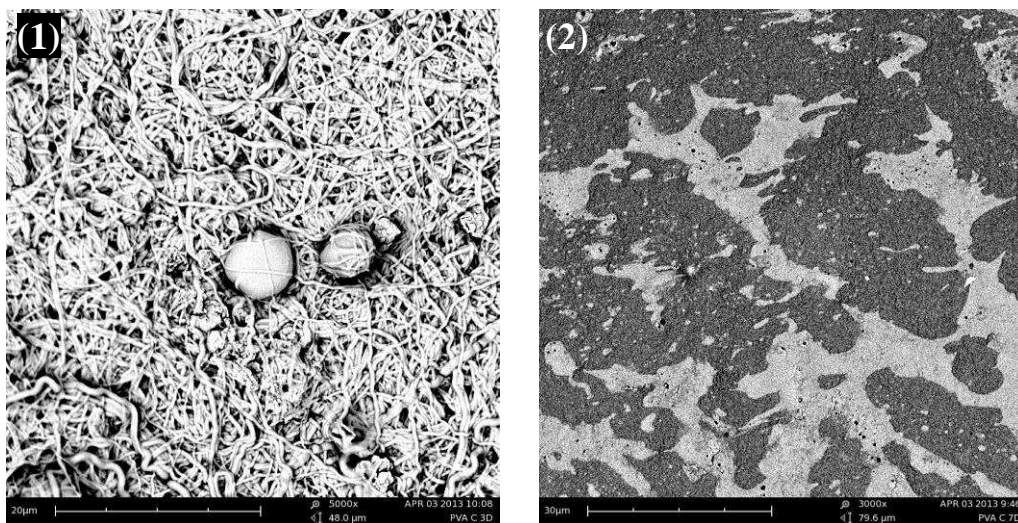


Obrázek 38 - Scaffold 12hm% PVA z kolektoru B s buňkami 3T3. (1) 3. den kultivace, měřítko 110 μm . (2) 7. den kultivace, měřítko 120 μm .

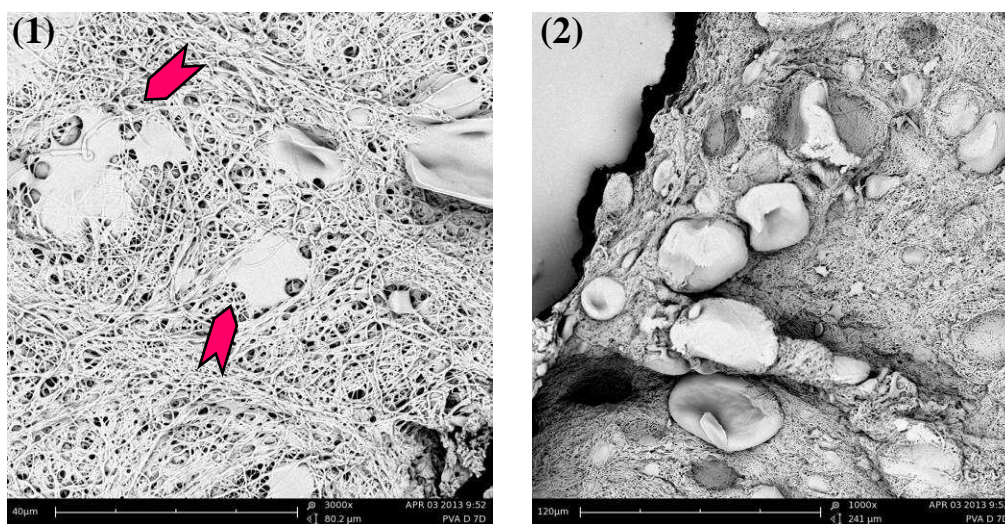
Na Obrázku 37 je patrné vrůstání buněk do scaffoldu, označeno šipkami. Buňky penetrovaly pod vrstvu nanovláken, lze identifikovat jednotlivá vlákna

pnoucí se přes buňku, což značí jejich krátkodobou aktivitu. Buňky pod vrstvou nanovláken lze nalézt na snímcích scaffoldů z 1., 3. i 7. dne od nasazení buněk. K odumření buňky tedy zřejmě došlo až po určitém časovém úseku.

Buňky neadherovaly na povrch scaffoldu, nepřilnuly na jednotlivá vlákna, jak vidíme na Obrázcích 37, 38, 39, 40. Buňky na povrchu, které nedokázaly vrůst do scaffoldu, jsou od nanovláknenné struktury striktně odděleny. Tento fenomén je patrný i na lomu scaffoldu či na okraji vzorku (Obrázek 37, 40).



Obrázek 39- Scaffold 12hm% PVA z kolektoru C s buňkami 3T3.
(1) 3. den kultivace, měřítko 120 µm. (2) 7. den kultivace, měřítko 30 µm.

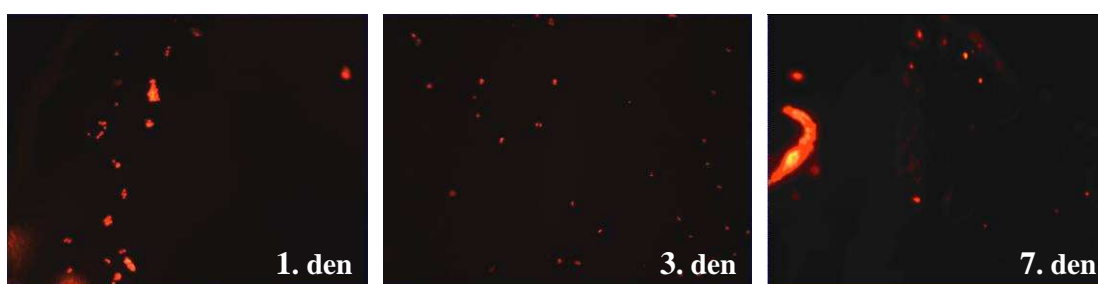


Obrázek 40 - Scaffold 12hm% PVA z deskového kolektoru s buňkami 3T3, 7. den kultivace.
Měřítka 40 µm (1), 130 µm (2).

Scaffold z kolektoru C (Obrázek 39) po 7 dnech kultivace v tekutém prostředí kultivačního média změnil charakter. Z nanovláknenné struktury, jež byla ještě 3. den detekovatelná, se struktura transformovala do téměř kontinuální polymerní vrstvy typu

fólie. To mohlo být způsobeno nerovnoměrným zesíťováním polymerních nanovláken či nevhodnou koncentrací síťovacích činidel.

Také fluorescenční mikroskopie potvrdila velmi nízký výskyt buněk, tato zobrazovací metoda nerozlišuje živé a mrtvé buňky. Na Obrázku 41 jsou snímky 1., 3. a 7. den od nasazení buněk na scaffold z kolektoru B. Vidíme, že počet buněk na zorné pole mikroskopu nevzrůstá, zůstává konstatní.



Obrázek 41 – Snímky z fluorescenčního mikroskopu 12hm% PVA scaffoldu z kolektoru B.

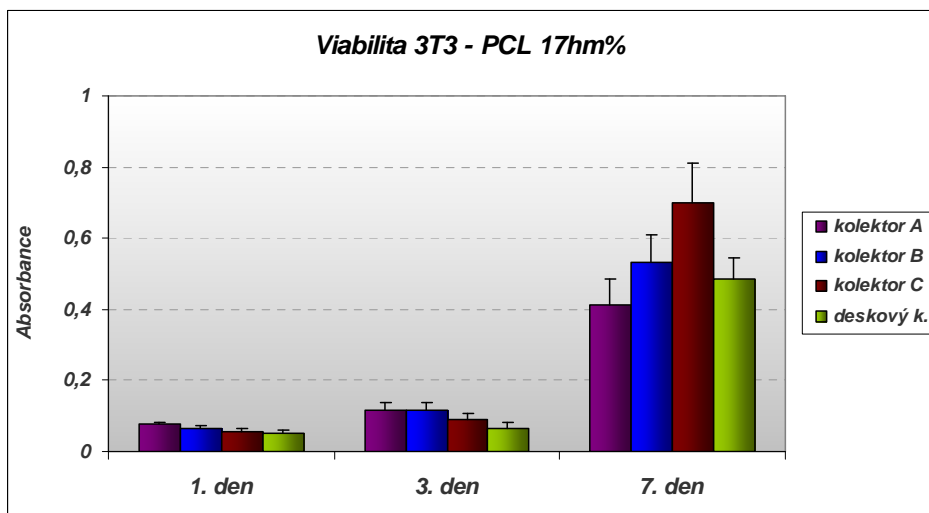
8.4.2 Buněčné testování 17hm% PCL

Nanovláknina z PCL již byla frekventovaně testována na cytokompatibilitu v Laboratoři tkáňového inženýrství Technické univerzity v Liberci s pozitivními výsledky. Polykaprolakton byl shledán výjimečně cytokompatibilním materiálem, jež je vhodný pro růst buněčného materiálu. PCL scaffoldy byly před zahájením testů také zkušebně testovány s pozitivními výsledky pro ověření cytokompatibility a správnosti procesu výroby scaffoldů a testování.

Viabilita buněk 3T3 na PCL scaffoldech dle MTT testu v průběhu 7 dnů testování vzrůstala na všech typech scaffoldů, jak dokládá histogram na Obrázku 42. Sedmý den od zahájení testování viabilita buněk výrazně vzrostla oproti 1. a 3. dni. Nejlépe buňky proliferovaly na scaffoldech z kolektorů B a C, tedy z kolektorů s průměry ok mříže 2 mm a 3 mm (viz Kapitola 7.2.1). Scaffoldy z těchto kolektorů vynikaly největšími póry v meziprostoru kovové mřížky.

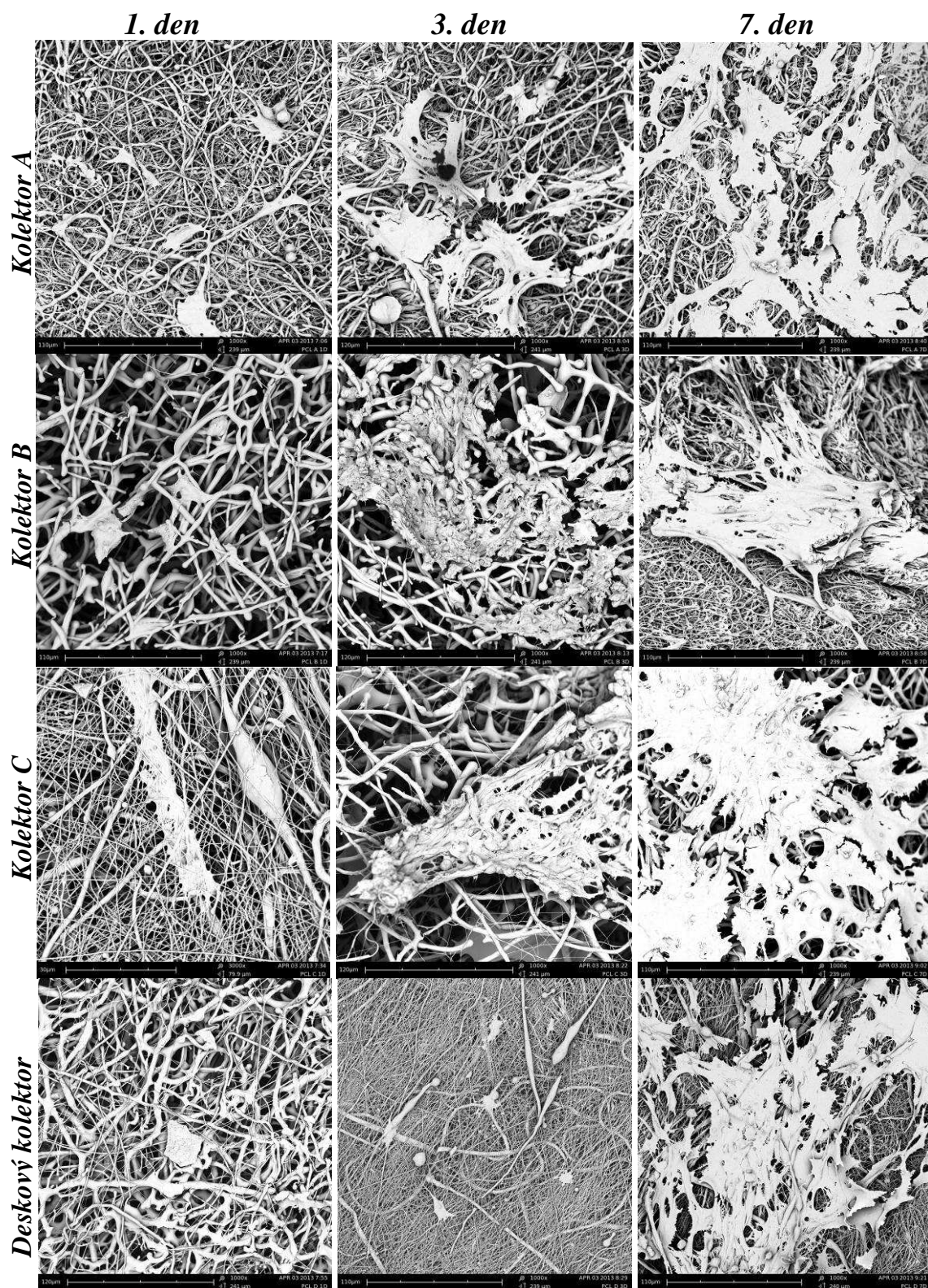
Nejlépe buněčná proliferace byla zaznamenána na scaffoldu z kolektoru C, kde póry v nanovláknenné vrstvě dosahovaly plochy $1,32 \mu\text{m}^2 \pm 42,37 \mu\text{m}^2$. Nejméně

proliferovaly buňky 1. a 3. den na scaffoldu z deskového kolektoru, 7. den nejmenší proliferaci vykazoval scaffold z kolektoru A, následně scaffold z deskového kolektoru. Právě scaffold z kolektoru A měl nejmenší póry z charakterizovaných scaffoldů, a to $0,95 \mu\text{m}^2 \pm 1,57 \mu\text{m}^2$.



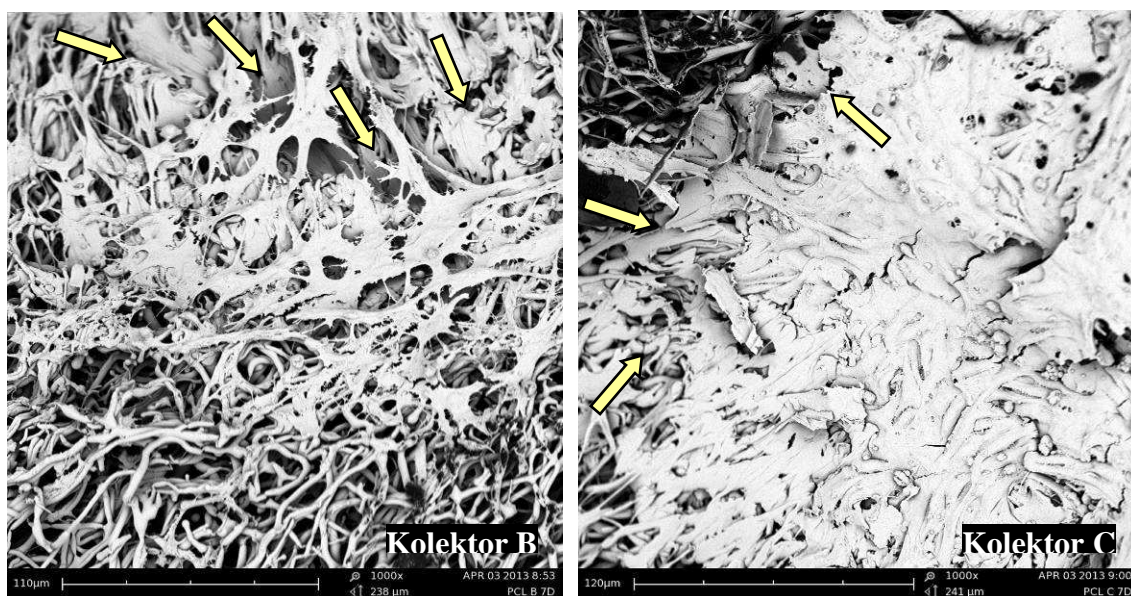
Obrázek 42 – Viabilita 3T3 buněk scaffoldech na 17hm% PCL.

Na Obrázku 43 vidíme srovnání míry proliferace 3T3 buněk na scaffoldech z definovaných kolektorů během 7 dnů pozorování. Po 1. dnu kultivace došlo k adhezi jednotlivých buněk na povrch nanovláknenné struktury, proliferace ještě neprobíhala. Ve 3. dnu pozorování je znatelná proliferace buněk, adheze na jednotlivá vlákna a rozrůstání po povrchu scaffoldu. Dochází k přemostění nanovláknenné struktury buňkami a šíření buněk převážně ve směru vláken. 7. den pozorování jsou již buňky značně proliferované, scaffold je na povrchu nekontinuálně pokrytý buňkami. Na snímku 7. dne na scaffoldu z kolektoru B je zřetelné, že buňky jsou přednostně adherovány na segment scaffoldu s nižší hustotou vláken, tedy z meziprostoru kolektorové mříže. Porovnáme-li větší množství snímků z 1. a 3. dne kultivace, pozorujeme, že buňky primárně adherují v daném segmentu na vlákna větších průměrů. Po adhezi proliferované buňky pro šíření a penetraci preferují vlákna menších průměrů. Tím se PCL scaffoldy stávají preferenčně výhodnými pro buněčnou proliferaci.



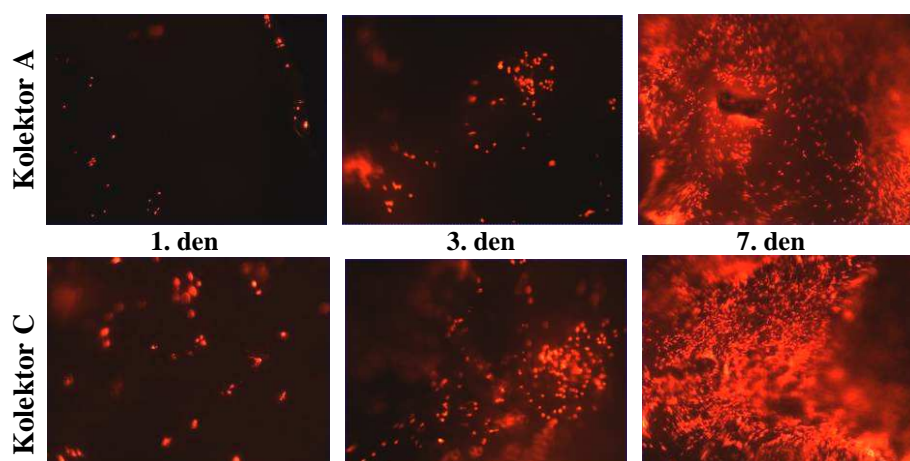
Obrázek 43 – Proliferace 3T3 buněk na scaffoldech 17hm% PCL v průběhu 7 dnů pozorování.

Ze snímků scaffoldů ze 7. dne kultivace je také pozorovatelná penetrace buněk do objemu scaffoldu. Na Obrázku 44 jsou scaffoldy z kolektorů B a C. Je zde evidentní vrůst buněk z povrchové vrstvy dále do matrice, označené šipkami. Na scaffoldech z kolektoru A a deskového kolektoru tento fenomén není prokazatelný. To koresponduje s výsledky MTT testu, kde při vizuálně obdobném pokrytí povrchů scaffoldů buňkami byla nejvyšší proliferace MTT testem stanovena na scaffoldu z kolektoru C.



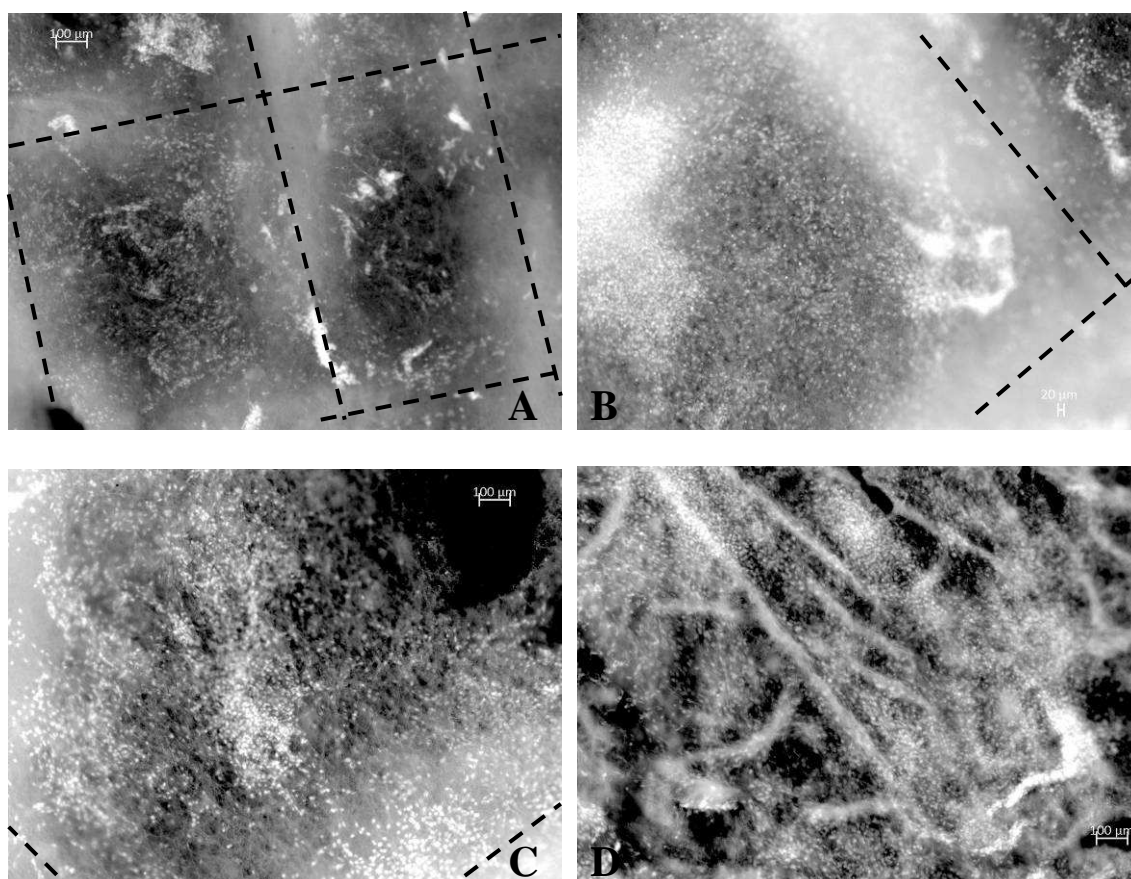
Obrázek 44 – SEM snímky proliferovaných buněk 3T3 na scaffoldech z kolektorů B (měřítko 110 µm) a C (měřítko 120 µm), 7. den kultivace. Šipkami označená penetrace buněk do objemu scaffoldu.

Srovnáme-li snímky fluorescenčního mikroskopu (Obrázek 45) scaffoldů z kolektorů A a C, na nichž byla dle MTT testu nejnižší a nejvyšší buněčná proliferace po 7 dnech, vidíme, že 1. a 3. den byl zřejmý rozdíl v počtu buněk na zorné pole mikroskopu. 7. den od nasazení buňky na obou scaffoldech výrazně proliferovaly, na scaffoldu z kolektoru C vidíme větší hustotu buněk v daném poli než na scaffoldu z kolektoru A.



Obrázek 45 – Fluorescenční mikroskopie 17hm% PCL scaffoldů s 3T3 buňkami z kolektorů A a C, zvětšení 10x. 1., 3. a 7. den od nasazení buněk.

Rozložení buněk na scaffoldu detekují snímky z fluorescenční mikroskopie na Obrázku 46. Černými liniemi je vyznačená síť kolektoru, která ovlivnila charakter nanovláknenné vrstvy. Vidíme, že buňky (světlé body) primárně adherovaly a proliferovaly na segmenty nanovláknenné vrstvy, jež se tvořily mezi kovovými příčkami kolektoru. Tyto segmenty ze speciálních kolektorů vynikaly především většími mezivláknennými póry a menší hustotou vláken. Na snímku scaffoldu z deskového kolektoru je rozložení buněk na scaffoldu konstantní.



Obrázek 46 – Fluorescenční mikroskopie nanovláknenných scaffoldů 17hm% PCL z kolektorů A, B, C a deskového kolektoru (D), zvětšení 5x. Liniemi zvýrazněna struktura scaffoldu dle mřížky kolektoru. Měřítka 100 μm .

9 Diskuze

9.1 *Struktura nanovláknenné vrstvy elektrostaticky zvlákněné na strukturované kolektory*

Jak je zmíněno v Kapitole 5.3, strukturu nanovláknenné vrstvy lze ovlivnit geometrií kolektoru. Předpokládá se, že změnou vzdálenosti jednotlivých vodivých elementů v kolektoru se změní tvar vnějšího elektrostatického pole. *Li a kol.* [58] provedli výpočet elektrostatických siločar a Coulombovy interakce mezi dvěma paralelními kolektory oddělenými nevodivou mezerou. Ukázalo se, že elektrostatické pole je silně ovlivněno rozložením vodivých a nevodivých segmentů kolektoru a je orientováno směrem k vodivým elementům, což způsobuje ukládání a protahování vláken. Kolektory použité v této diplomové práci svojí strukturou způsobily nehomogenní rozložení elektrostatického pole. Jak lze vidět na Obrázku 26, výsledná změna elektrostatického pole ovlivňuje specifické uspořádání vláken na kolektoru. Na kolektorech A, B, C (viz Kapitola 7.2.1) vznikaly nanovláknenné vrstvy strukturované dle mříže kolektoru. Na vrstvách jsou makroskopicky pozorovatelné segmenty s vyšší a nižší hustotou vláken, což je v souladu se studií *Vaquette a Cooper-White* [54].

V nanovláknenném scaffoldu připraveném metodou elektrostatickým zvlákněním jsou velikosti pórů korespondující s průměry vláken a lze předpokládat, že velikost pórů bude stejného řádu jako průměr vláken. *Lowery a kol.* [48] prokázali, že mezi velikostí pórů a průměry vláken je lineární závislost. Charakterizací elektrostaticky zvlákněných scaffoldů 12hm% PVA a 17hm% PCL (Kapitola 8.1) na strukturované kolektory jsme dokázali, že použití strukturovaných kolektorů vhodných parametrů je efektivní způsob, jak zvýšit velikosti pórů v elektrostaticky zvlákněném scaffoldu. Porovnáme-li hodnoty průměrů vláken a velikostí pórů ze strukturovaných kolektorů s vlákny z deskového kolektoru (Tabulka 6, 7), můžeme konstatovat, že jsme schopni výrazně zvýšit velikost pórů při zachování konstantních nebo i menších průměrů vláken.

9.2 Buněčná kolonizace elektrostaticky zvlákněných scaffoldů

Buněčná kolonizace elektrostaticky zvlákněných scaffoldů je klíčovým bodem v tkáňovém inženýrství. Homogenní kolonizace scaffoldu je předpokladem pro vývoj homogenně rekonstruované tkáně. Většina studií, jež se zabývají elektrostaticky zvlákněnými scaffoldy, prověřuje cytokompatibilitu materiálu či vlastnosti scaffoldu ovlivňující adhezi a proliferaci buněk. Teprve v nedávné době začala být pozornost soustředěna na infiltraci buněk do celého objemu scaffoldu. Bylo konstatováno [59], že důvodem nízké buněčné infiltrace do elektrostaticky zvlákněného scaffoldu jsou malé velikosti pórů nanovlákněné vrstvy.

Jak již bylo zmíněno, velikosti pórů odpovídají řádově průměrům nanovláken v dané vrstvě. Aby byl zachován nanorozměr průměrů vláken a kompaktnost vrstvy, je třeba snížit hustotu vláken, čímž dojde k zvětšení mezivlákněných pórů, což podpoří buněčnou infiltraci a proliferaci.

Námi vyrobené scaffoldy vykazují řádově větší póry v segmentech mezi kovovými příčkami kolektorů, než scaffoldy z deskového kolektoru. Bylo prokázáno, že tyto scaffoldy zlepšují buněčnou proliferaci a penetraci buněk do objemu matrice. V 1. a 3. dnu kultivace buněk na PCL scaffoldech byly buňky pozorovány spíše na povrchu, 7. den byla patrná i penetrace buněk do objemu scaffoldu. Proliferace a penetrace buněk byla nejlepší na scaffoldech z kolektoru B a C, jež vykazovaly největší mezivlákněné póry. Tato studie vede k závěru, že větší velikosti pórů v elektrostaticky zvlákněné nanovlákněné vrstvě jsou přínosné pro buněčnou proliferaci a kolonizaci scaffoldu. Tento závěr koresponduje s výsledky studií *J. Rnjak-Kovacina a kol.* [49], *Lowery a kol.* [48] a *Vaquette a Cooper-White* [54].

Další směr výzkum s cílem dále zlepšovat buněčnou infiltraci do scaffoldu navrhuji spojení zvětšování velikostí pórů pomocí strukturovaných kolektorů vhodné geometrie a modifikace scaffoldu pro lepší adhezi buňky, lepší vedení buněk do objemu scaffoldu, například sofistikovanou povrchovou úpravou. Bod, který by neměl zůstat v daném směru vývoje opomenut, je vymezení maximální velikosti mezivlákněných pórů pro jednotlivé typy buněk, jež ještě nezamezuje přemostění vláken danými buňkami a tím šíření buněk ve všech směrech 3D matrice.

Závěr

V rešeršní části této diplomové práce jsou shrnuty výrobní metody porézních scaffoldů s důrazem na elektrostatické zvlákňování, možnosti modifikace procesu elektrostatického zvlákňování či zvlákňovaných materiálů a vlivu dané modifikace na zvýšení velikosti mezivláknenných pórů elektrostaticky zvlákněné nanovláknenné vrstvy. Velmi efektivní metodou se ukázalo použití speciálních strukturovaných kolektorů, jež ovlivní ukládání vláken a tím homogenitu nanovláknenné vrstvy. Na tuto problematiku je zaměřena experimentální část diplomové práce.

Byly navrženy tři typy speciálních strukturovaných kolektorů mřížového charakteru s rozdílnými parametry mříže. Nanovláknenné vrstvy vytvořené na těchto kolektorech byly nehomogenní, svojí strukturou velice dobře imitovaly strukturu mříže kolektoru. Na vrstvách vznikaly segmenty s vyšší a nižší plošnou hmotností, jež se projevila rozdílnou hustotou vláken. V segmentech s nižší hustotou vláken velikost pórů vzrostla až 5x v porovnání s nanovláknennou vrstvou z vodivého deskového kolektoru. Velikost pórů byla závislá na rozprostření vodivých a nevodivých elementů kolektorové mříže. Následným biologickým testováním bylo prokázáno, že buňky lépe proliferují na scaffoldech s většími mezivláknennými póry. Zvýšení velikosti pórů elektrostaticky zvlákněných scaffoldů podpořilo buněčnou proliferaci a penetraci buněk do objemu matrice v porovnání se scaffoldy z deskového kolektoru. Průměry vláken testovaných scaffoldů se pohybovaly od stovek nanometrů až po jednotky mikrometrů, tyto rozměry vláken neměly signifikantní vliv na buněčnou proliferaci.

Výsledky této diplomové práce potvrzují, že scaffoldy připravené metodou elektrostatickým zvlákňováním jsou vhodným materiálem pro kultivaci a proliferaci zvláště menších typů buněk. Vláknenný charakter elektrostaticky zvlákněných vrstev má velký potenciál jako biomimetická náhrada extracelulární matrix, a to v případě, že bude zvládnutá technologie snižování hustoty vláken a s tím související zvětšování velikosti pórů. Dle výsledků diplomové práce lze konstatovat, že všechny cíle diplomové práce byly splněny.

Seznam použité literatury

- [1] WAN-JU, Li, et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials* [online]. 2002, Vol. 60, Issue 4, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.10167/full>>.
- [2] PRICE, R.L., GUTWEIN, L.G., KALEDIN, L., TEPPER, F., WEBSTER, T.J. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. *J. Biomed. Mater. Res. A* 67, 1284, 2003.
- [3] PAPENBURG, B. DESIGN STRATEGIES FOR TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS [online]. Enschede, 2009 [cit. 2012-05-05]. Dostupné z: http://doc.utwente.nl/61561/1/thesis_B_Papenburg.pdf. Disertační práce. University of Twente. Vedoucí práce Prof. dr.ing. M. Wessling.
- [4] VOKURKA, Martin, et al. *Velký lékařský slovník*. 8. vyd. : Maxdorf, 2009. 1144 s. ISBN 978-80-7345-166-0.
- [5] LUKÁŠ, David; MARTINOVÁ, Lenka. *Lékařské textilie : 2. díl*. 1. Vyd. Praha : Asociace inovačního podnikání ČR, 2008. 248 s.
- [6] FREYMAN, T.M., I.V. YANNAS a L.J. GIBSON. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science* [online]. 2001, Vol. 46, issue 3-4 [cit. 2012-05-04]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079642500000189>
- [7] HO, Ming-Hua, Pei-Yun KUO, Hsyue-Jen HSIEH, Tzu-Yang HSIEN, Lein-Tuan HOU, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00483-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203004836>
- [8] WHANG, K., C.H. THOMAS, K.E. HEALY, G. NUBER, Lein-Tuan HOU, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/0032-3861(95)93115-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0032386195931153>
- [9] HARRIS LD, KIM B.-S., MOONEY DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998;42(3):396-402. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(19981205)42:3<396::AID-JBM7>3.0.CO;2-E. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-4636%2819981205%2942:3%3C396::AID-JBM7%3E3.0.CO;2>
- [10] SINGH, Lakhwant, Vipin KUMAR, Buddy D. RATNER, G. NUBER, Lein-Tuan HOU, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Generation of porous microcellular 85/15 poly (dl-lactide-co-glycolide) foams for biomedical applications: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.040. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203007762>
- [11] WANG, Xiaoxi, Wei LI, Vipin KUMAR, G. NUBER, Lein-Tuan HOU, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. A method for solvent-free fabrication of porous polymer using solid-state foaming and ultrasound for tissue engineering applications: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.09.029. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205008719>
- [12] LIPS, P.A.M., I.W. VELTHOEN, P.J. DIJKSTRA, M. WESSLING, J. FEIJEN, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Gas foaming of segmented poly(ester amide) films: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.07.052. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386105010505>
- [13] KIM, Sang-Soo, Min SUN PARK, Oju JEON, Cha YONG CHOI, Byung-Soo KIM, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205007775>

- [14] KRAUSE, B., K. DIEKMANN, N. F. A. VAN DER VEGT, M. WESSLING, Byung-Soo KIM, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Open Nanoporous Morphologies from Polymeric Blends by Carbon Dioxide Foaming: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1021/ma011672s. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma011672s>
- [15] KRAUSE, B., K. DIEKMANN, N. F. A. VAN DER VEGT, M. WESSLING, Byung-Soo KIM, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Advanced Materials: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 0935-9648. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma011672s>
- [16] KRAUSE, B., H. J. P. SIJBESMA, N. F. A. VAN DER VEGT, M. WESSLING, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Bicontinuous Nanoporous Polymers by Carbon Dioxide Foaming: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1021/ma010854j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma010854j>
- [17] MA, Peter X., Ji-Won CHOI, N. F. A. VAN DER VEGT, M. WESSLING, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1089/107632701300003269. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/107632701300003269>
- [18] ROYCHOWDHURY, P., V. KUMAR, N. F. A. VAN DER VEGT, M. WESSLING, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Fabrication and evaluation of porous 2,3- dialdehydecellulose membrane as a potential biodegradable tissue-engineering scaffold: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1002/jbm.a.30503. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30503>
- [19] KIM, So Yeon, Toshiyuki KANAMORI, Yoshiko NOUMI, Pi-Chao WANG, Toshio SHINBO, Juin-Yih LAI a Da-Ming WANG. Preparation of porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) membranes by a phase inversion process and investigation of their morphological changes as cell culture scaffolds: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1002/app.20144. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.20144>
- [20] LIU, Hwa-Chang, I-Chi LEE, Jyh-Horng WANG, Shu-Hua YANG a Tai-Horng YOUNG. Preparation of PLLA membranes with different morphologies for culture of MG-63 Cells. [online]. [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.098. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203010536>
- [21] ZOPPI, R.A, S. CONTANT, E.A.R DUEK, F.R MARQUES, M.L.F WADA a S.P NUNES. Porous poly(l-lactide) films obtained by immersion precipitation process: morphology, phase separation and culture of VERO cells. [online]. [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1016/S0032-3861(98)00562-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003238619800562X>
- [22] GUAN, Jianjun, Kazuro L. FUJIMOTO, Michael S. SACKS, William R. WAGNER, M.L.F WADA a S.P NUNES. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications: morphology, phase separation and culture of VERO cells. [online]. [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120400938X>
- [23] HUA, Feng Jun, Go Eun KIM, Jong Doo LEE, Yong Keun SON, Doo Sung LEE a S.P NUNES. Macroporous poly(L-lactide) scaffold 1. Preparation of a macroporous scaffold by liquid-liquid phase separation of a PLLA-dioxane-water system: morphology, phase separation and culture of VERO cells. [online]. [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1002/jbm.10121. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.10121>
- [24] LI, Shirong, Vincenzo LA CARRUBBA, Stefano PICCAROLO, Diana SANNINO, Valerio BRUCATO a S.P NUNES. Preparation and properties of poly(L-lactic acid) scaffolds by thermally induced phase separation from a ternary polymer-solvent system: morphology, phase separation and culture of VERO cells. [online]. [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1002/pi.1631. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.1631>
- [25] NAM YS, PARK TG. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999;47(1):8-17.
- [26] HTAY, A. S., S. H. TEOH a D. W. HUTMACHER. Development of perforated microthin poly(ϵ -caprolactone) films as matrices for membrane tissue engineering. [online]. [cit. 2013-04-

- 29]. DOI:10.1163/156856204323046933. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856204323046933>
- [27] PARK YJ, NAM KH, HA SJ, PAI CM, CHUNG CP, LEE SJ. Porous poly(L-lactide) membranes for guided tissue regeneration and controlled drug delivery: Membrane fabrication and characterization. *Journal of Controlled Release* 1997 Jan 18;43(2-3):151-160.
- [28] TANAKA M, TAKEBAYASHI M, MIYAMA M, NISHIDA J, SHIMOMURA M. Design of novel biointerfaces (II). Fabrication of self-organized porous polymer film with highly uniform pores. *Bio-Medica Materials And Engineering* 2004;14(4):439-446.
- [29] VAQUETTE C, FAWZI-GRANCHER S, LAVALLE P, FROCHOT C, VIRIOT ML, MULLER S, et al. In vitro biocompatibility of different polyester membranes. *Bio-Medical Materials And Engineering* 2006;16(4):S131-S136. ISSN: 0959-2989. Dostupné z:
<http://iospress.metapress.com/content/cj3py18pmmj8ayeh/>
- [30] CAUSA, F., P. A. NETTI, L. AMBROSIO, G. CIAPETTI, N. BALDINI, S. PAGANI, D. MARTINI a A. GIUNTI. Poly-ε-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: In vitro characterization and human osteoblast response. [online]. [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1002/jbm.a.30528. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30528>
- [31] M. CIMA, E. SACHS, T.L. FAN, J.F. BREDET, S.P. MICHAELS, S. KHANUJA, A. LAUDER, S.J. LEE, D. BRANCAZIO, A. CURODEAU, H. TUECK, United States Patent No. 5387380 (1995).
- [32] E.M. SACHS, M. CIMA, P. WILLIAMS, D. BRANCAZIO, J. CORNIE, Trans. ASME, Ser. B 114 (1992) 481.
- [33] LEE, S.-J.J., E. SACHS a M. CIMA. Layer position accuracy in powder-based rapid prototyping. *Rapid Prototyping Journal* [online]. 1995, vol. 1, issue 4, s. 24-37 [cit. 2013-05-07]. DOI: 10.1108/13552549510104447. Dostupné z:
<http://www.emeraldinsight.com/10.1108/13552549510104447>
- [34] WU, Benjamin M., Scott W. BORLAND, Russell A. GIORDANO, Linda G. CIMA, Emanuel M. SACHS a Michael J. CIMA. Solid free-form fabrication of drug delivery devices: morphology, phase separation and culture of VERO cells. [online]. [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1016/0168-3659(95)00173-5. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365995001735>.
- [35] RŮŽICKOVÁ, J. *Elektrostatické zvláknování nanovláken*: Skriptum TUL, 2004. 65 s. ISBN 80-7083-867-1.
- [36] THE TEXTILE INSTITUTE. Textile progress. Vol. 41. London: Taylor and Francis, 2009. ISBN 0040-5167.
- [37] FREYMAN, T.M., I.V. YANNAS a L.J. GIBSON. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science* [online]. 2001, Vol. 46, issue 3-4 [cit. 2012-05-04]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079642500000189>
- [38] PETER, Ma. Scaffolds for tissue fabrication. Materials today [online]. 2004, Issue 5 [cit. 2012-11-28]. ISSN 1369-7021. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702104002330>.
- [39] SEJEDNERAD, H., D. GAWLITA a R.V. KUIPER. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(ε-caprolactone). *Biomaterials* [online]. Oxford: Elsevier Ltd., 2012, issue 17 [cit. 2012-11-28]. ISSN 0142-9612. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212002748>.
- [40] SHABANI Iman, HADDADI-ASL Vahid, SEYEDJAFARI Ehsan, SOLEIMANI Masoud, *Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 423, Issue 1, 22 June 2012, Pages 50-54, ISSN 0006- 291X, 10.1016/j.bbrc.2012.0.069.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X12009461>)
- [41] Centropede. *Nanofibrous materials for tissue engineering* [online]. 2006 [cit. 2013-05-07]. Dostupné z: <http://www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/background.html>
- [42] RENEKER, Darrell H a Hao FONG. *Polymeric nanofibers*. Washington, DC: Distributed by Oxford University Press, c2006, xii, 430 p., [15] p. of plates. ISBN 978-084-1239-197.
- [43] DAMS, R.I., A. BISWAS, A. OLESIEJUK, T. FERNANDES a N. CHRISTOFI. Silver nanotoxicity using a light-emitting biosensor *Pseudomonas putida* isolated from a wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials* [online]. roč. 195, s. 68-72 [cit. 2013-04-29]. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.013. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389411010181>

- [44] VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. *Lékařská histologie I.: cytologie a obecná histologie*. 1. vyd. Praha, 2010, 110 s. ISBN 978-80-246-1860-9.
- [45] PAULSEN, Douglas F. *Histologie a buněčná biologie: opakování a příprava ke zkouškám*. 1. vyd. Překlad Václava Konrádová. Praha: Nakladatelství H H, 2004, 433 s. ISBN 80-731-9024-9.
- [46] O'BRIEN, F.J., B.A. HARLEY, I.V. YANNAS a L.J. GIBSON. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* [online]. 2005, roč. 26, č. 4, s. 433-441 [cit. 2013-03-04]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.052. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204002017>
- [47] KARAGEORGIOU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* [online]. 2005, roč. 26, č. 27, s. 5474-5491 [cit. 2013-03-04]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205001511>
- [48] LOWERY, Joseph L., Neha DATTA a Gregory C. RUTLEDGE. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials* [online]. 2010, roč. 31, č. 3, s. 491-504 [cit. 2013-03-04]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.072. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209010242>
- [49] RNJAK-KOVACINA, Jelena, Steven G. WISE, Zhe LI, Peter K.M. MAITZ, Cara J. YOUNG, Yiwei WANG a Anthony S. WEISS. Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2011, roč. 32, č. 28, s. 6729-6736 [cit. 2013-03-11]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.065. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211006363>
- [50] SHABANI, Iman, Vahid HADDADI-ASL, Ehsan SEYEDJAFARI a Masoud SOLEIMANI. Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2012, roč. 423, č. 1, s. 50-54 [cit. 2013-03-11]. ISSN 0006291x. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.069. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X12009461>
- [51] BADAMI, Anand S., Michelle R. KREKE, M. Shane THOMPSON, Judy S. RIFFLE a Aaron S. GOLDSTEIN. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials* [online]. 2006, roč. 27, č. 4, s. 596-606 [cit. 2013-03-11]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.084. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205005247>
- [52] RIBEIRO NETO, Wilson A., Ildeu H.L. PEREIRA, Eliane AYRES, Ana C.C. DE PAULA, Luc AVEROUS, Alfredo M. GOES, Rodrigo L. OREFICE a Rosario Elida SUMAN BRETAS. Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. Electrospinning, characterization and cell viability. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, roč. 97, č. 10, s. 2037-2051 [cit. 2013-03-12]. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.03.048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391012001371>
- [53] VENUGOPAL, J., Sharon LOW, Aw Tar CHOON, A. Bharath KUMAR a S. RAMAKRISHNA. Electrospun-modified nanofibrous scaffolds for the mineralization of osteoblast cells: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2008, 85A, issue 2, s. 408-417 [cit. 2013-05-07]. DOI: 10.1002/jbm.a.31538. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31538>
- [54] VAQUETTE, Cedryck a Justin John COOPER-WHITE. Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, roč. 7, č. 6, s. 2544-2557 [cit. 2013-03-12]. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.02.036. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111001061>
- [55] PECHOVÁ, Nad'a. *Sítování polyvinyl alkoholových nanovláken*. Liberec, 2004. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Martinová Lenka.
- [56] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 278 s. ISBN 80-708-0617-6.
- [57] LENAU, Torben. *Biopolymers.net* [online]. 2003 [cit. 2011-04-20]. Material. Dostupné z WWW: <<http://www.designinsite.dk/htmsider/m0954.htm>>.
- [58] LI, Dan, Yuliang WANG a Younan XIA. Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays. *Nano Letters* [online]. 2003, vol. 3, issue 8, s. 1167-1171 [cit. 2013-03-12].

- 2013-05-07]. DOI: 10.1021/nl0344256. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl0344256>
- [59] PHAM, Quynh P., Upma SHARMA a Antonios G. MIKOS. Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Biomacromolecules* [online]. 2006, vol. 7, issue 10, s. 2796-2805 [cit. 2013-05-07]. DOI: 10.1021/bm060680j. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm060680j>
- [60] Biologické vědy a nervová soustava. *E-learningová podpora mezioborové integrace výuky tématu vědomí na UP Olomouc* [online]. 2011 [cit. 2013-05-07]. Dostupné z:
<http://pfyziolfup.upol.cz/castwiki/?p=845>
- [61] Microscopy by the people, for the people. *Dried testes on a stub* [online]. 2009 [cit. 2013-05-07]. Dostupné z:
<http://www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/opt307/spr09/amir/Slideshow.html>

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Snímky syntetických porézních matric připravených metodou: a) freeze-drying, b) particle leaching, c) phase separation, d) foaming, e) 3D printing, f) electrospinning [37, 38, 39] ..	19
Obrázek 2 – Buněčná adheze na nanovláknenný a mikrovláknenný scaffold [41]	20
Obrázek 3 – Eukaryotická buňka (Copyright 2003, Paerson Educatin, Inc.) [60].....	23
Obrázek 4 – Erytrocyt v prostředí ECM (měřítko v levém rohu odpovídá 1 μm) [61]	26
Obrázek 7 – Buněčná aktivita a tvorba ECM v 1., 7., 14. a 21. dnu od osazení scaffoldu S1 (a-d), S2 (e-h) buňkami. Vyobrazení SEM. [48]	30
Obrázek 8 – Migrace a proliferace lidských dermálních fibroblastů na SHE scaffoldy SC1 a SC2 v průběhu 8 dnů. Fibroblasty zbarveny modře. Měřítka 200 μm . [49].....	32
Obrázek 9 – Systém „light emission array“ elektrospinningu. A – celá aparatura, B – fokusace světla na poslední třetinu jetu v blízkosti kolektoru. [50].....	33
Obrázek 10 – Makroskopický snímek vrstev vyrobených konvenčním (vlevo) a modifikovaným elektrospinningem (vpravo). [50]	33
Obrázek 11 – Snímky příčných řezů scaffoldů osazených kmenovými buňkami po 1 dni (A, C)	33
Obrázek 12 – Imonufluorescenční zbarvení adherovaných buněk. Hladký povrch PDLLA (vlevo) a PDLLA nanovlákná průměru 2,1 μm (vpravo). [51].....	34
Obrázek 13 – TEM snímky nanovláken : a, b – PLA-nHA 1%, c, d – PLA-nHA 5%,.....	36
Obrázek 14 – Morfologie speciálních kolektorů. (a-c) Kruhové kolektory s rostoucím průměrem ok: (a) 0,75 mm, (b) 2 mm, (c) 3mm. (d-f) síťové kolektory: (d) 0,5 mm, (e) 3,3 mm, (f) 5 mm. (g) Kruhový kolektor s 1mm ostrůvkem uprostřed děr, (h) Hvězdicový kolektor, (i) Žebříkový kolektor. [54]	37
Obrázek 15 – Morfologie scaffoldů zvlákněných na síťové kolektory. (a, b) malé síto 0,5 mm, (c, d) střední síto 3,3 mm, (e, f) velké síto 5 mm. Detaily vláken byly snímány z volného prostoru v síti. [54]	38
Obrázek 16 – Morfologie scaffoldů zvlákněných na kruhové kolektory. (a, b) malý kruh 0,75 mm, (c, d) střední kruh 2 mm, (e, f) velký kruh 3 mm. Detaily vláken byly snímány z volného prostoru v kruhu. [54]	38
Obrázek 17 – Porozita a velikost pórů scaffoldů zvlákněných na definovaných kolektorech. [54]	39
Obrázek 18 – Průměry PCL vláken elektrostaticky zvlákněných na charakterizované kolektory. [54] ...	39
Obrázek 19 – Morfologie a penetrace fibroblastů po 7 dnech kultivace nasazených na scaffoldech zvlákněných na charakterizované kolektory. (a, b, c) – deskový kolektor, (d, e, f) – střední kruhový kolektor, (g, h, i) – velký kruhový kolektor. [54]	40
Obrázek 20 – Vzorce chemikálií použitých při přípravě roztoku 12hm% PVA: a) polyvinylalkohol ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$) _n , b) glyoxal $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$, c) kyselina fosforečná H_3PO_4	43
Obrázek 21 – Vzorce chemikálií použitých při přípravě roztoku 17% PCL: a) polykaprolakton ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$) _n , b) chloroform CHCl_3 , c) ethanol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	44
Obrázek 22 – Schéma zvláknovací soustavy a fotografie strunového válečku.....	44

Obrázek 26 – Makroskopická struktura nanovláknenné vrstvy 17hm% PCL zvlákněného	51
Obrázek 27 – Morfologie povrchu a přechod hustoty vláken v nanovláknenné vrstvě 12hm% PVA (a, 51	
Obrázek 28 – SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na kolektor A.	53
Obrázek 29 - SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na kolektor B.	54
Obrázek 30 - SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na kolektor C.	55
Obrázek 31 – SEM snímky nanovláken 12hm% PVA zvlákněných na deskový kolektor (D).	55
Obrázek 32 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na kolektor A.	57
Obrázek 33 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na kolektor B.	58
Obrázek 34 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na kolektor C.	59
Obrázek 35 - SEM snímky nanovláken 17hm% PCL zvlákněných na deskový kolektor (D).	60
Obrázek 36 – Viabilita 3T3 buněk na scaffoldech 12hm% PVA.	61
Obrázek 37 – Scaffold 12hm% PVA z kolektoru A s buňkami 3T3, 7. den kultivace.	62
Obrázek 38 - Scaffold 12hm% PVA z kolektoru B s buňkami 3T3.	62
Obrázek 39 - Scaffold 12hm% PVA z kolektoru C s buňkami 3T3.	63
Obrázek 40 - Scaffold 12hm% PVA z deskového kolektoru s buňkami 3T3, 7. den kultivace.	63
Obrázek 41 – Snímky z fluorescenčního mikroskopu 12hm% PVA scaffoldu z kolektoru B.	64
Obrázek 42 – Viabilita 3T3 buněk scaffoldech na 17hm% PCL.	65
Obrázek 43 – Proliferace 3T3 buněk na scaffoldech 17hm% PCL v průběhu 7 dnů pozorování.	66
Obrázek 44 – SEM snímky proliferovaných buněk 3T3 na scaffoldech z kolektorů B (měřítko 110 μm) a C (měřítko 120 μm), 7. den kultivace. Šípkami označená penetrace buněk do objemu scaffoldu.	67
Obrázek 45 – Fluorescenční mikroskopie 17hm% PCL scaffoldů s 3T3 buňkami z kolektorů A a C, zvětšení 10x. 1., 3. a 7. den od nasazení buněk.	68
Obrázek 46 – Fluorescenční mikroskopie nanovláknenných scaffoldů 17hm% PCL z kolektorů A, B, C a deskového kolektoru (D), zvětšení 5x. Liniemi zvýrazněna struktura scaffoldu dle mříže kolektoru. Měřítka 100 μm.	69

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Organely eukaryotické buňky.....	24
Tabulka 2 – Příklady buněk lidského organismu s charakterizovanou velikostí.....	25
Tabulka 3 – Charakteristika vybraných scaffoldů zkoumaných <i>Lowery a kol.</i>	30
Tabulka 4 – Vlastnost scaffoldů SC1, SC2	31
Tabulka 5 – Průměry nanovláken	35
Tabulka 6 – Střední hodnoty průměru vláken a plochy pórů nanovláknenných vrstev 12hm% PVA	52
Tabulka 7 - Střední hodnoty průměru vláken a plochy pórů nanovláknenných vrstev 17hm% PCL.	56

Příloha A

Graf A – Závislost počtu buněk na optické denzitě

